

# **Charakterisierung der PII-P Phosphatase in Cyanobakterien**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Angelika Irmeler  
aus Münsing

Gießen, Mai 2001

Dekan: Prof. Dr. Janek

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Forchhammer

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1. Energiegewinnung durch oxigene Photosynthese</b>	<b>1</b>
<b>2. Aufnahme und Assimilation von Kohlenstoff</b>	<b>2</b>
<b>3. Stickstoffstoffwechsel in Cyanobakterien</b>	<b>3</b>
3.1. Aufnahme von Stickstoff	3
3.2. Assimilation von Ammonium	4
3.3. Regulation des Stickstoffstoffwechsels	5
3.3.1. Transkriptionskontrolle durch NtcA	5
3.3.2. Die Regulation der Glutaminsynthetase	6
3.3.3. Die Rolle des PII Proteins	7
3.3.4. PII in Proteobakterien	7
3.3.5. PII paraloge Proteine	8
3.3.6. PII in Cyanobakterien	9
<b>4. Protein - Phosphorylierung in Bakterien</b>	<b>10</b>
4.1. Proteinkinasen und -phosphatasen	11
4.2. Protein O – Phosphorylierung in Cyanobakterien	12
<b>5. Aufgabenstellung</b>	<b>13</b>
<b>B. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
<b>1. verwendete Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide</b>	<b>15</b>
<b>2. Kultivierung von Bakterien</b>	<b>18</b>
2.1. Anzucht von Cyanobakterien	18
2.2. Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	18
<b>3. Analytische Methoden</b>	<b>19</b>

<b>4. Physiologische Tests</b>	<b>19</b>
4.1. <i>In vivo</i> Markierung mit [ <sup>32</sup> P] Orthophosphat	19
4.2. Messung der Glutaminsynthetase-Aktivität	20
4.3. Bestimmung der Nitrat- und Nitritreduktaseaktivität	20
4.4. <i>in vivo</i> Dephosphorylierung von PII-P	20
4.5. Nitrat-abhängige O <sub>2</sub> Entwicklung	20
<b>5. Biochemische Methoden</b>	<b>21</b>
5.1. Standardmethoden	21
5.2. Analyse des Phosphorylierungszustandes von PII	21
5.3. Reinigung von Proteinen	22
5.3.1. Reinigung von phosphoryliertem PII (PII-P)	22
5.3.2. Herstellung des teilgereinigten PII-P Phosphatase-Extraktes aus MP2 Zellen	22
5.3.3. Reinigung der PII-P Phosphatase, PphA, aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803 nach Überproduktion in <i>E. coli</i>	23
5.4. <i>in vitro</i> Aktivitätstests der PII-P Phosphatase PphA	24
5.4.1. Dephosphorylierung von PII-P	24
5.4.2. Dephosphorylierung von P-Casein, P-Histonen und P-Kemptid	25
<b>6. Immunologische Methoden</b>	<b>26</b>
<b>7. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>26</b>
7.1. Standardmethoden	26
7.2. Polymerase-Kettenreaktion	27
7.3. Herstellung der Insertionsmutanten	27
7.4. Southern-Blot Analysen	28
7.5. Isolierung von RNA und Northern-Blot Analysen	28
<b>8. Bezugsquellen</b>	<b>29</b>
<b>9. Datenverarbeitung</b>	<b>30</b>

## **C. Ergebnisse** **31**

### **1. *In vitro* Analysen der teilgereinigten PII-P Phosphatase aus *Synechococcus* PCC 7942** **31**

- 1.1. *in vitro* PII-P Dephosphorylierung 31
- 1.2. Substratspektrum der PII-P Phosphatase 32
- 1.3. Hemmung der Phosphataseaktivität 33

### **2. Versuche zur Reinigung der PII-P Phosphatase** **36**

### **3. Identifizierung der PII-P Phosphatase in *Synechocystis* PCC 6803** **39**

- 3.1. Putative Phosphatasen in *Synechocystis* PCC 6803 39
- 3.2. Inaktivierung putativer Phosphatasen 41
  - 3.2.1. slr 0114 41
  - 3.2.2. sll 0602 41
  - 3.2.3. sll 1033 41
  - 3.2.4. sll 1365 42
  - 3.2.5. sll 1771 42
  - 3.2.6. sll 1387 42
  - 3.2.7. sll 1329 43
  - 3.2.8. sll 0135 43
  - 3.2.9. slr 1983 43
- 3.3. Analyse des PII Status der Mutanten nach  $\text{NH}_4^+$  Schock 45
- 3.4. Analyse der *in vivo*  $^{32}\text{P}$  Markierung 46

### **4. Physiologische Charakterisierung von MPpHA** **48**

- 4.1. *in vivo* Dephosphorylierung von PII-P 48
- 4.2. Gibt es weitere Phosphatasen, die PII-P dephosphorylieren? 49
- 4.3. Untersuchungen zum Wachstum / funktionelle Analyse von *pphA* 49
  - 4.3.1. Wachstum bei verschiedenen Stickstoffbedingungen 49
  - 4.3.2. Wachstum bei niedriger  $\text{CO}_2$  Konzentration 52
  - 4.3.3. Stickstoffentzug 55
  - 4.3.4. Nitrat-abhängige  $\text{O}_2$  Freisetzung 55
- 4.4. Expression von *glnA*, *glnN* und *rbcL* 56

4.5. Bestimmung der Transkriptgröße von <i>pphA</i>	57
<b>5. Biochemische Charakterisierung von PphA</b>	<b>58</b>
5.1. Überproduktion und Reinigung von PphA	58
5.2. Enzymatische Aktivität von PphA	59
5.2.1. Dephosphorylierung von PII-P und Phosphocasein	59
5.2.2. Einfluß von 2-wertigen Kationen	60
5.2.3. Einfluß von Redoxzustand, pH und Salzgehalt auf die PphA Aktivität	62
5.3. Bestimmung der kinetischen Parameter	63
5.4. Dephosphorylierung von Oligopeptiden	64
5.5. Regulation der PphA	65
5.5.1. Einfluß von ATP und 2-Oxoglutarat auf die Aktivität der PphA	65
5.5.2. Wirkung von weiteren Nukleotiden und 2-Oxoglutarat	66
5.5.3. Wirkung von Metaboliten des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels	69
<b>6. Die PP2C Phosphatase PphA - Sequenzvergleich und Stammbaumanalyse</b>	<b>72</b>
<b>D. Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>1. MPphA, die PII-P Phosphatase defiziente Mutante aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803 T</b>	<b>76</b>
<b>3. Biochemische Eigenschaften</b>	<b>80</b>
<b>4. PphA und weitere PP2C Phosphatasen</b>	<b>86</b>
<b>E. Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>

## Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cpm	Zerfälle pro Minute
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Einstein (mol Photonen s <sup>-1</sup> m <sup>2</sup> )
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
g	Erdbeschleunigung
GOGAT	Glutamin: $\alpha$ -Oxoglutarat Aminotransferase (Glutamat-Synthase)
GS	Glutamin Synthetase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kD	kilo-Dalton
M	Molar
min	Minute
MSX	L-Methionin-D,L-Sulfoximin
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Photosystem
psi	pounds per square inch
r	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase

SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
rpm	Umdrehungen pro min
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen



## A. Einleitung

Cyanobakterien sind autotrophe Organismen, die oxigene Photosynthese betreiben und die innerhalb der Eubakterien ein eigenes Phylum darstellen. Cyanobakterien waren wesentlich an der Entwicklung des Lebens auf der Erde beteiligt, indem sie zur Entstehung der aeroben Atmosphäre beitrugen. Gemäß der Endosymbiontentheorie (Douglas, 1994) stellen sie die Vorläufer der Chloroplasten von Algen und höheren Pflanzen dar. Heute besiedeln Cyanobakterien verschiedenste und teilweise extreme Standorte, von Ozeanen und heißen Quellen bis zu trockenen Wüsten. Die Assimilation einfacher anorganischer Verbindungen, und bei verschiedenen Arten die Fähigkeit zur Stickstofffixierung und zu Symbiosen, sowie die Ausbildung spezieller Zellen, wie z.B. Akineten und Baeocyten, ermöglichen die Anpassung an diese unterschiedlichen Lebensräume (Tandeau de Marsac et al., 1993); Luque et al., 1994).

### 1. Energiegewinnung durch oxigene Photosynthese

Wie in allen Organismen, die zur Energiegewinnung oxigene Photosynthese betreiben, erfolgt auch in Cyanobakterien die Photolyse des Wassers durch die zwei gekoppelten Photosysteme I und II (PSI und PSII), die in die Thylakoidmembran eingebettet sind. Die photochemische Energieumwandlung findet an den Chlorophyll a enthaltenden Reaktionszentren P 680 und P 700 statt, wodurch der Elektronentransport der, letztendlich aus der Oxidation des Wasser stammenden Elektronen, angetrieben wird. Der dabei über der Membran entstehende Protonengradient dient der Regenerierung von ATP. Der terminale Elektronenakzeptor ist Ferredoxin, das im reduzierten Zustand, durch die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase NADP<sup>+</sup> reduzieren kann.

Das eintreffende Licht wird durch Antennenkomplexe absorbiert und die Anregungsenergie wird an das Reaktionszentrums-Chlorophyll weitergeleitet. Bei Cyanobakterien und Rotalgen dienen als Antennenpigmente die Phycobilisomen, die aus den Phycobiliproteinen Phycocyanin, Allophycocyanin und, bei manchen Arten, auch aus Phycoerythrin mit Absorptionsmaxima von 650 nm, 620 nm und 570 nm, bestehen. Die Zusammensetzung der Pigmente ist von dem Spektralbereich des einfallenden Lichtes abhängig und ermöglicht die optimale Nutzung unterschiedlicher Lichtbedingungen, z.B. in verschiedenen Wassertiefen.

Dieser Anpassungsprozeß wird als komplementäre chromatische Adaptation bezeichnet (Grossman et al., 1994).

Eine weitere, kurzzeitige Anpassung zur optimalen Lichtnutzung ist die „state transition“ genannte Verteilung der von den Phycobilisomen absorbierten Lichtenergie auf die beiden Photosysteme. Strahlt Licht ein, das bevorzugt Chlorophyll a anregt, wird die von den Phycobilisomen absorbierte Energie auf PSII transferiert („state 1“). Wenn hauptsächlich die Pigmente der Phycobilisomen angeregt werden, erfolgt auch die Übertragung der absorbierten Energie auf PSI („state 2“). Wie in grünen Pflanzen scheint auch in Cyanobakterien der Übergang durch den Redoxstatus des Plastoquinonpools reguliert zu werden (Fujita et al., 1994).

## 2. Aufnahme und Assimilation von Kohlenstoff

Die Anpassung von Cyanobakterien an unterschiedliche Konzentrationen von  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  ( $\text{C}_i$ ) wird durch den Mechanismus der Kohlenstoffkonzentrierung in der Zelle ermöglicht („carbon-concentrating mechanism“, CCM). Der CCM umfaßt die aktive Aufnahme von  $\text{C}_i$  in die Zelle, die Akkumulation von  $\text{HCO}_3^-$  im Cytoplasma und die Umwandlung von  $\text{HCO}_3^-$  in  $\text{CO}_2$ .

In hohen Konzentrationen vorliegendes  $\text{CO}_2$  wird durch niederaffine Aufnahmesysteme in die Zelle transportiert, während bei niedrigen  $\text{CO}_2$  Konzentrationen spezielle, hochaffine Aufnahmesysteme induziert werden (Kaplan et al., 1994). Bislang sind allerdings solche Transportsysteme kaum charakterisiert. Bedu et al., (1995) beschrieben ein Protein, HataA (high affinity transport), welches essentiell bei  $\text{CO}_2$  Limitierung in *Synechocystis* PCC 6803 ist. Die genaue Funktion von HataA ist aber nicht klar. Von Omata et al. (1999) wird der erste cyanobakterielle hochaffine  $\text{HCO}_3^-$  Transporter, BCT1, beschrieben, ein ABC Transporter, der durch *cmpABCD* codiert wird. Die Gene *cmpABCD* weisen hohe Ähnlichkeit mit den Genen des *nirA* Operons auf und sind ebenfalls als Operon strukturiert. Ebenso wie das periplasmatische, substratbindende Lipoprotein NrtA Nitrat und Nitrit bindet (Maeda et al., 1998), bindet CmpA mit hoher Affinität  $\text{HCO}_3^-$  (Maeda et al., 2000).

Im Cytoplasma wird  $\text{C}_i$  als  $\text{HCO}_3^-$  akkumuliert und anschließend in den Carboxysomen, Einschlußkörpern, in denen die  $\text{CO}_2$  Fixierung durch die RubisCO (Ribulose-1-5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase) stattfindet, durch die Carboanhydrase zu  $\text{CO}_2$  dehydriert. Dadurch ist sichergestellt, daß die RubisCO trotz des hohen  $K_M$ -Wertes von 600  $\mu\text{M}$  ausreichend mit

CO<sub>2</sub> versorgt wird. Das Produkt der CO<sub>2</sub> Fixierung durch den Calvin Zyklus, 3-Phosphoglycerat, wird über Fructose-6-Phosphat zu dem Energie- und Kohlenstoffspeicher Glycogen umgewandelt oder über glycolytische Reaktionen und den Tricarbonsäurezyklus in Vorstufenmoleküle für biosynthetische Reaktionen metabolisiert. Der Tricarbonsäurezyklus in Cyanobakterien ist inkomplett, es fehlen die Enzyme Succinatdehydrogenase und 2-Oxoglutaratdehydrogenase, so daß das entstehende 2-Oxoglutarat nicht in katabolischen Reaktionen verbraucht wird, sondern ausschließlich anabolische Funktion hat (Stanier et al., 1977).

### 3. Stickstoffstoffwechsel in Cyanobakterien

Stickstoff ist ein essentieller Bestandteil organischer Materie und eines der quantitativ wichtigsten Elemente. Der Anteil von Stickstoff an einer cyanobakteriellen Zelle kann bis 11 % Trockengewicht betragen (Wolk, 1973). Alle Cyanobakterien können Stickstoff in Form von Ammonium, Nitrat und Nitrit verwerten. Einige Arten fixieren molekularen Stickstoff (diazotrophe Cyanobakterien) oder verwenden organische Stickstoffquellen, wie z.B. Harnstoff, Cyanat und Aminosäuren. Der einzellige, obligat photoautotrophe Organismus *Synechococcus* PCC 7942, ebenso wie der fakultativ heterotrophe *Synechocystis* PCC 6803, sind nicht diazotroph. Ein Mangel an gebundenen Stickstoffquellen löst bei nicht diazotrophen Cyanobakterien, z.B. *Synechococcus* PCC 7942, eine Depigmentierung der Zellen aus. Dieses, als Chlorose bezeichnete Ausbleichen, tritt auch bei Mangel an Schwefel, Phosphor oder Kohlenstoff auf und geht mit einer Anpassung der Zellen an Nährstoffmangel einher, die das Überleben in einem Ruhezustand ermöglicht (Görl et al., 1998; Collier und Grossmann, 1992).

#### 3.1. Aufnahme von Stickstoff

Die am häufigsten in der Natur vorkommende gebundene Stickstoffquelle Nitrat wird über das hochaffine NrtABCD Transportsystem aufgenommen, das zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette) gehört (Omata et al., 1993). Nitrit wird über denselben, bispezifischen Transporter in die Zelle transportiert oder kann über ein eigenes Aufnahmesystem aufgenommen werden (Luque et al., 1994; Maeda et al., 1998b). Nitrat wird

durch die Enzyme Nitratreduktase (NarB) zu Nitrit und anschließend durch die Nitritreduktase (NirA) zu Ammonium reduziert. Da als Elektronendonator Photosystem I reduziertes Ferredoxin dient, ist die Nitratreduktion ein ursächlich photosynthetischer Prozeß. Lichtmangel führt deshalb zwischen der Nitratreduktion und der CO<sub>2</sub> Fixierung zu einer Kompetition um reduziertes Ferredoxin (Flores et al., 1983). Die Gene, die das NrtABCD Transportsystem und die Nitrat- und Nitritreduktase codieren, sind bei *Synechococcus* PCC 7942 im *nirA* Operon, *nirA-nrtABCD-narB*, lokalisiert. Bei *Synechocystis* PCC 6803 sind diese Gene ähnlich arrangiert, mit der Ausnahme, daß sich *nirA* an anderer Stelle im Genom befindet (Kaneko et al., 1996).

Die bevorzugte, weil energetisch günstigste Stickstoffquelle der Cyanobakterien ist Ammonium. In höheren Konzentrationen gelangt Ammonium, ebenso wie Nitrat und Nitrit, unprotoniert durch Diffusion in die Zelle, in niedrigen Konzentrationen wird es durch hochaffine Permeasen aufgenommen. Drei *amt* Gene, die Ammonium Permeasen codieren, wurden in dem Genom von *Synechocystis* PCC 6803 identifiziert (Montesinos et al., 1998).

### 3.2. Assimilation von Ammonium

Der wichtigste Weg der Inkorporation von Ammonium bei Bakterien und Pflanzen ist der Glutaminsynthetase/ Glutamatsynthase (GS/GOGAT) -Weg, wobei Ammonium unter ATP-Verbrauch durch die GS auf Glutamat übertragen wird und Glutamin entsteht. Die Amidogruppe des Glutamins wird durch die Ferredoxin-abhängige Glutamatsynthase unter Bildung von zwei Molekülen Glutamat auf 2-Oxoglutarat übertragen (Merrick und Edwards, 1995; Meeks et al., 1978). Ein alternativer, ATP-unabhängiger Weg der Ammoniumassimilation führt über das Enzym Glutamatdehydrogenase und wird v.a. von Enterobakterien bei hoher Ammoniumkonzentration verwendet (Reitzer und Magasanik., 1987). Bei Cyanobakterien spielt dieser Weg der Stickstoffassimilation allerdings eine untergeordnete Rolle und *Synechococcus* PCC 7942 besitzt überhaupt keine Glutamatdehydrogenase (Flores und Herrero, 1994).

Glutamat und Glutamin sind die universellen Stickstoffdonatoren für biosynthetische Reaktionen, wobei Glutamin auch als Ausgangssubstanz für die Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen dient. Glutamat wird für die Tetrapyrrolsynthese und damit für die Chlorophyll a und Phycobilinsynthese benötigt.

Glutaminsynthetasen lassen sich nach Primärstruktur und nach dem Aufbau der Untereinheiten in drei Typen einteilen, von denen zwei, Typ I und Typ III in Cyanobakterien vorhanden sind. Die am häufigsten vorkommende Form der Glutaminsynthetasen, die klassische, prokaryontische Form GSI, ist ein dodekameses Enzym und wird von dem Gen *glnA* codiert (Merrick und Edwards, 1995; Flores und Herrero, 1994; Reyes et al., 1997). Die Glutaminsynthetase vom Typ III, GlnN, ist ein Hexamer und wurde in zahlreichen nicht-diazotrophen Cyanobakterien identifiziert, u.a. in *Synechocystis* PCC 6803 und in *Synechococcus* PCC 7942 (Reyes und Florencio, 1994; Sauer et al., 2000). Die Expression von *glnN* wird spezifisch durch Stickstoffmangel induziert und scheint in *Synechococcus* PCC 7942 einen selektiven Vorteil bei langanhaltendem Stickstoffmangel zu verleihen (Sauer, 2001; García-Domínguez et al., 1997).

### **3.3. Regulation des Stickstoffstoffwechsels**

Die Assimilation verschiedener Stickstoffquellen ist strikt reguliert und die Anpassung an die unterschiedlichen Stickstoffangebote erfordert eine genaue Regulation der Gene, die für die Assimilation verschiedener Stickstoffquellen notwendig sind, sowie eine Kontrolle der Aktivität der beteiligten Enzyme.

Ammonium stellt die energetisch günstigste Stickstoffquelle dar und wird bevorzugt verwertet. Die Anwesenheit von Ammonium reprimiert die Assimilation von Nitrat, die Stickstofffixierung und die Bildung von Heterocysten, ein Prozeß, der als Ammoniumrepression bezeichnet wird (Flores und Herrero, 1994). Hierfür ist eine aktive Glutaminsynthetase notwendig (Tapia et al., 1995; Herrero et al., 2001).

#### **3.3.1. Transkriptionskontrolle durch NtcA**

Die Transkription stickstoffregulierter Gene wird in Cyanobakterien nicht, wie in Enterobakterien, durch das Zwei-Komponenten-System NtrB/NtrC aktiviert, sondern durch den Transkriptionsaktivator NtcA (Vega-Palas et al., 1992). NtcA gehört zur CRP-Familie bakterieller Transkriptionsfaktoren und besitzt C-terminal ein Helix-Turn-Helix Motiv zur Bindung an die DNA. In *Synechococcus* PCC 7942 wurde gezeigt, daß NtcA an die palindromische DNA Sequenz GTAN<sub>8</sub>TAC bindet, die die -35 Box ersetzt (Luque et al.,

1994). Die -10 Box NtcA-aktivierter Promotoren ähnelt mit der Sequenz TAN<sub>3</sub>T der des *E.coli*  $\sigma^{70}$  Promotors und derjenigen des dazu homologen vegetativen  $\sigma$ -Faktors SigA aus Cyanobakterien, so daß möglicherweise NtcA die Transkription mit Hilfe eines vegetativen  $\sigma$ -Faktors aktiviert.

NtcA ist einerseits an der Aktivierung der Transkription stickstoffregulierter Gene, wie z.B. dem *nirA* Operon, *glnA*, *glnN*, *amt1* und *hetC* beteiligt, andererseits unterliegen auch *glnB*, welches das Signaltransduktionsprotein PII codiert und der Gruppe 2  $\sigma$ -Faktor *rpoD2-V* der NtcA-Kontrolle (Herrero et al., 2001; Muro-Pastor et al., 2001). Darüberhinaus erfolgt eine Autoregulation von NtcA und auch Gene, die nicht direkt mit der Stickstoffregulation in Zusammenhang stehen, werden durch NtcA gesteuert. In *Anabaena* sp. Stamm PCC 7120 wurde die Regulation von *rbcLS*, das für die RubisCO und *gor*, das für die Glutathionreduktase codiert, durch NtcA beschrieben, so daß vermutlich nicht nur der Stickstoffstatus, sondern auch der Redoxstatus Regulationsparameter für NtcA sind (Jiang et al., 1997).

Für die Expression des *nirA* Operons wird ein weiterer Transkriptionsfaktor, das zur LysR Familie gehörende NtcB, benötigt (Aichi et al., 1997). Nitrit wirkt dabei als positiver allosterischer Effektor auf NtcB, wobei der positiven Regulation durch Nitrit und NtcB, die Induktion der *nirA* Transkription durch NtcA vorausgeht (Kikuchi et al., 1996; Maeda et al., 1998a).

### 3.3.2. Die Regulation der Glutaminsynthetase

Die Anwesenheit von Ammonium bewirkt sowohl eine posttranslationelle Inaktivierung der GSI Aktivität, als auch eine transkriptionelle Hemmung von *glnA* (Mérida et al., 1991; Cohen-Kupiec et al., 1993). Untersuchungen aus *Synechocystis* PCC 6803 zeigten, daß die beiden Inaktivierungsfaktoren IF7 und IF17 durch Protein-Protein Interaktion die Glutaminsynthetase Aktivität reversibel inhibieren (García-Domínguez et al., 1999). Die Transkription der entsprechenden Gene, *gifA* und *gifB*, wird durch NtcA entgegengesetzt zu *glnA* reguliert. In Anwesenheit von Ammonium liegt NtcA in einer inaktiven Form vor und aktiviert weder die Expression von *glnA*, noch reprimiert es diejenige von *gifA* und *gifB*. GSI wird auf basalem Niveau gebildet und durch die laufend gebildeten Inaktivierungsfaktoren

inhibiert. Stickstoffmangel führt zur Aktivierung von NtcA, das die Transkription von *glnA* aktiviert und von *gifA* und *gifB* reprimiert (García-Domínguez et al., 2000).

### 3.3.3. Die Rolle des PII Proteins

PII Proteine gehören zu den am weitesten verbreiteten und am besten konservierten Signaltransduktionsproteinen in Bakterien, Archaea und in Eukaryonten. Die Aufgabe der PII Proteine in Bakterien und Archaea liegt in der Integration und Weiterleitung von Signalen des Kohlenstoff- und Stickstoffstatus (Ninfa et al., 2000). PII ist ein homotrimeres Protein mit 12,3 kD je Untereinheit, wobei jede Untereinheit als Antwort auf Signale des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels kovalent am T-Loop modifiziert werden kann.

### 3.3.4. PII in Proteobakterien

Die biochemischen und genetischen Mechanismen der Stickstoffkontrolle sind am besten in Enterobakterien untersucht, in denen das PII Protein einen zentralen Signaltransmitter des Kohlenstoff- und Stickstoffstatus darstellt und maßgeblich an der Regulation der Glutaminsynthetase beteiligt ist (Ninfa und Atkinson, 2000; Mangum et al., 1973). Das PII Protein von Enterobakterien wird durch Uridylylierung am Tyrosin 51 kovalent modifiziert, das sich an der Spitze des T-Loops befindet, der für die Interaktion mit den drei Rezeptoren, UTase/UR, Adenylyltransferase (ATase) und der Kinase/Phosphatase NtrB notwendig ist (Jiang et al., 1997). Die Modifikation von PII wird durch das bifunktionelle Enzym Uridylyltransferase/Uridylylhydrolase (UTase/UR) katalysiert (Adler et al., 1975). Die Uridylylierung von PII erfordert ATP und 2-Oxoglutarat, die synergistisch an PII und an PII-UMP binden (Kamberov et al., 1995), wobei 2-Oxoglutarat das Signalmolekül des Kohlenstoffstoffwechsels darstellt. Die Ligandierung jeder Untereinheit mit 2-Oxoglutarat bewirkt bereits eine Konformationsänderung von PII, so daß keine Interaktion mit der ATase und mit NtrB möglich ist (Jiang et al., 1999). Das Signalmolekül des Stickstoffstoffwechsels ist Glutamin, das von dem Enzym UTase/UR sensiert wird und maßgebend für den Grad der Uridylylierung ist. Ein hoher Glutamingehalt bei Stickstoffsuffizienz stimuliert die UR-Aktivität wobei PII-UMP deuridylyliert wird (Jiang et al., 1998 b). Die aktuellen Kohlenstoff-

und Stickstoffsignale werden somit am PII Protein integriert und durch dessen Konformation und Modifikation an die Rezeptoren weitervermittelt.

Die Glutaminsynthetase wird in *E. coli* auf mindestens drei Arten reguliert. Die posttranslationelle Regulation erfolgt zum einen durch „feedback“ Hemmung verschiedener stickstoffhaltiger Komponenten und zum anderen durch reversible kovalente Adenylylierung durch das Enzym ATase (Shapiro et al., 1967; Merrick und Edwards, 1995). Bei Stickstoffsuffizienz wird die Adenylylierung der GS durch PII und durch Glutamin, das direkt von der ATase sensiert wird, stimuliert. Die Deadenylylierung bei Stickstoffmangel wird dagegen durch 2-Oxoglutarat, ATP und PII-UMP aktiviert (Jiang et al., 1998 c). Forchhammer et al., (1999) zeigten *in vivo*, daß die Adenylylierung der GS bei Ammoniumzugabe auch ohne funktionierendes PII-System erfolgt, was auf eine mögliche alternative Regulation der GS Aktivität hinweist.

Die transkriptionelle Kontrolle des Strukturgens der GS, *glnA*, erfolgt durch das Zwei-Komponenten System NtrB/NtrC. Der Sensor NtrB wirkt bei Stickstoffmangel als Kinase, die den Transkriptionsaktivator NtrC phosphoryliert. Phosphoryliertes NtrC-P aktiviert durch Bindung an die DNA die Transkription stickstoffregulierter Gene. Bei Stickstoffsuffizienz liegt PII deuridylyliert vor und stimuliert durch Interaktion mit der konservierten Kinasedomäne von NtrB dessen regulierte Phosphataseaktivität, wodurch autophosphoryliertes NtrC-P dephosphoryliert wird und keine Bindung an die DNA erfolgt (Atkinson et al., 1994; Merrick und Edwards, 1995; Pioszak et al., 2000.).

Weitere, durch NtrB/NtrC regulierte Gene, codieren die Transportsysteme von Aminosäuren, der Nitrat- und Nitritassimilation und der Stickstofffixierung.

### **3.3.5. PII paraloge Proteine**

Einige Bakterien besitzen weitere, PII ähnliche Proteine, wie z.B. GlnK, das ebenfalls modifiziert werden kann und speziell unter Stickstoffmangelbedingungen gebildet wird (Ninfa und Atkinson, 2000). In *E.coli* ist GlnK vermutlich an der Regulation der Expression stickstoffregulierter Gene beteiligt, wobei PII und GlnK hinsichtlich ihrer Funktionen nicht gegeneinander austauschbar sind (Atkinson und Ninfa, 1998). Möglicherweise wirkt GlnK auch als „memory“ Protein, das die Reaktion der Zelle auf eine kurzzeitige Ammoniumzufuhr



nach langem Stickstoffmangel verzögert (v.Heeswijk et al., 1996). Forchhammer et al. (1999) wiesen die Bildung von Heterotrimeren zwischen GlnK und PII Monomeren nach, wodurch in Organismen mit multiplen PII Homologen, eine zusätzliche Regulationsebene möglich ist.

In *Azospirillum brasiliense* ist PII (*glnB*) spezifisch für die Stickstofffixierung erforderlich und ist zusammen mit dem funktionell unterschiedlichen P<sub>z</sub> Homolog für die Optimierung des Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus verantwortlich (de Zamaroczy et al., 1996 und 1998).

### 3.3.6. PII in Cyanobakterien

Das erste PII Protein (*glnB*) in Cyanobakterien wurde von Harrison et al. (1990) in *Synechococcus* PCC 6301 entdeckt. Tsinores et al. (1991) zeigten in *Synechococcus* PCC 7942 eine von der Stickstoffquelle und der Beleuchtung abhängige kovalente Modifikation des PII Proteins und Forchhammer und Tandeau de Marsac (1994) fanden schließlich, daß die posttranslationelle Modifikation von PII, im Gegensatz zu der Uridylylierung bei Enterobakterien, durch Phosphorylierung erfolgt. Jede Untereinheit des trimeren 36 kD Proteins kann an dem Serinrest 49 phosphoryliert werden, so daß es vier mögliche Modifikationen von PII gibt, unphosphoryliert oder mit einer, zwei oder drei phosphorylierten Untereinheiten. Die Phosphorylierung von PII korreliert mit dem Stickstoffstatus und der CO<sub>2</sub>-Versorgung der Zellen, wobei Stickstoffmangel die stärkste Phosphorylierung bewirkt (PII<sup>3,2</sup>). Bei Wachstum mit Ammonium oder bei CO<sub>2</sub> Mangel liegt PII in der unmodifizierten Form, PII<sup>0</sup>, vor und bei Wachstum mit Nitrat hängt der Phosphorylierungsgrad von PII von der CO<sub>2</sub> Versorgung ab. Um ideal wachsen zu können, benötigen Zellen ein ausgewogenes Verhältnis von Stickstoff und Kohlenstoff, was eine koordinierte Assimilation der beiden Nährstoffe erfordert und eine Funktion von PII liegt in dieser Koordination des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995 a und b). Im Gegensatz zum bifunktionellen PII-Modifikationsenzym Utase/UR, werden in Cyanobakterien die Phosphorylierung von PII und die Dephosphorylierung von PII-P durch zwei getrennt vorliegende Enzyme (Dierks, 1997), eine Kinase und eine Phosphatase ausgeführt. Die Phosphorylierung von PII durch eine Kinase wird *in vitro* durch 2-Oxoglutarat stimuliert, wobei ATP als Phosphoryldonor fungiert. Forchhammer und Hedler (1997) zeigten in Bindungsstudien, daß in Anwesenheit von ATP 2-Oxoglutarat synergistisch an PII bindet und daß PII, wie in *E.coli* (Kamberov et al., 1995), den Sensor der

intrazellulären 2-Oxoglutarat Konzentration darstellt. 2-Oxoglutarat kommt in Cyanobakterien ausschließlich eine anabolische Funktion als Kohlenstoffskelett für die Inkorporation von Ammonium durch den GS/GOGAT Weg zu. Der 2-Oxoglutarat Spiegel ist somit ein Maß für die Balance der CO<sub>2</sub>- und der Ammoniumassimilation und wird durch die Bindung an PII sensiert.

An einer NtcA-defizienten Mutante wurde von Lee et al. (1999) und Sauer (2001) gezeigt, daß die Phosphorylierung, nicht aber die Dephosphorylierung von PII teilweise NtcA abhängig reguliert wird. Eine mögliche Ursache ist, daß durch die NtcA-abhängig transkribierte Isocitratdehydrogenase (Muro-Pastor et al., 1996) nicht genügend 2-Oxoglutarat für eine ausreichende Ligandierung von PII bereitgestellt und somit keine vollständige Phosphorylierung ermöglicht wird.

In *Synechococcus* PCC 7942 ist PII auch an der durch Ammonium ausgelösten Repression der Nitrat- und Nitritaufnahme beteiligt (Lee et al. 1998). Welche Bedeutung dabei der Phosphorylierungszustand von PII hat, ist nicht vollständig geklärt. (Lee et al., 2000).

In *Synechocystis* PCC 6803 ist PII auch an der Aufnahme von Bicarbonat beteiligt und verhindert bei hoher CO<sub>2</sub> Versorgung der Zellen die Aktivierung des hochaffinen Bicarbonataufnahmesystems (Hisbergues et al., 1999).

Im Gegensatz zum enterobakteriellen PII, das wesentlich zur Regulation der GS Aktivität beiträgt, scheint PII von Cyanobakterien nicht an einer Regulation der GS beteiligt zu sein (García- Domínguez et al. 2000).

#### **4. Protein-Phosphorylierung in Bakterien**

Die posttranslationelle Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung ist in allen lebenden Organismen ein wichtiger Mechanismus der Signalübertragung. Durch Proteinphosphorylierung werden verschiedenste zelluläre Prozesse, wie z.B. Chemo- und Phototaxis, Zelldifferenzierung, Genexpression, Stoffwechsel und Infektiösität reguliert, wodurch eine Anpassung der Zellen an unterschiedliche Umweltbedingungen ermöglicht wird (Kennelly et al., 1999). Es sind drei evolutionär unterschiedliche Formen der Proteinphosphorylierung bekannt. Das klassische Zwei-Komponenten-System besteht aus einer, meistens membrangebundenen, Sensor-Kinase und dem Response-Regulator. Die

Sensor-Kinase wird auf einen Stimulus hin an einem Histidinrest autophosphoryliert und überträgt die Phosphorylgruppe auf einen Aspartatrest des Response-Regulators, wodurch dessen, meist transkriptionelle Aktivität reguliert wird. Der phosphorylierte Response-Regulator wird entweder durch eine spontane Autophosphataseaktivität oder durch die regulierte Phosphataseaktivität der Sensor-Kinase dephosphoryliert. In *E.coli* z.B. wird durch die PII stimulierte Phosphataseaktivität von NtrB der phosphorylierte Response-Regulator NtrC dephosphoryliert (Saier et al., 1990; Kamberov et al., 1995). Zwei-Komponenten-Systeme können durchaus mehrere phosphorylierbare Komponenten enthalten, wie das Sporulationskontrollsystem von *Bacillus subtilis*, das aus vier Komponenten besteht (Perraud et al., 1999). Ein weiteres Phosphorylierungssystem ist das Phosphotransferasesystem (PTS), dessen Hauptfunktion die Gruppentranslokation von Zuckern ist. Die Phosphorylgruppe des Donors Phosphoenolpyruvat wird dabei über eine Reihe phosphorylierbarer Proteine des PTS schließlich auf den transportierten Zucker übertragen (Saier, 1995). Die dritte Gruppe der Phosphorylierungssysteme umfaßt die O-Phosphorylierungen, d.h. die ATP-abhängige Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten unter Ausbildung einer Phosphomonoesterbindung. Diese Art der Phosphorylierung wurde zuerst in Eukaryonten entdeckt, die Bedeutung in Bakterien und Archaea tritt aufgrund biochemischer und genomischer Analysen zunehmend zutage. In jedem untersuchten bakteriellen und archaealen Genom wurden bisher putative Proteinkinasen und -phosphatasen eukaryontischen Typs identifiziert. Keines der Phosphorylierungssysteme ist jedoch auf eine Domäne beschränkt und so wurden in Eukaryonten ebenso „bakterielle“ Protein-Histidin-Kinasen gefunden (*ETR1* in *Arabidopsis thaliana*; *SLN1* in *Saccharomyces cerevisiae*), wie „eukaryontische“ Proteinkinasen („Hanks-type“ Kinasen) in Bakterien und Archaea (*pkn1* in *Myxococcus xanthus*; *MJ0444* in *Methanococcus jannaschii*) (Kennelly und Potts, 1996; Shi et al., 1998).

#### **4.1. Proteinkinasen und -phosphatasen**

Die Superfamilie der Proteinkinasen eukaryontischen Typs, der „Hanks-type“ Kinasen, enthält fünf Familien von Proteinkinasen, mit Vertretern in Bakterien und Archaea, die nach den jeweiligen Prototypen Pkn2, ABC1, RIO1, piD261 und AQ578-Familien genannt werden (Leonard et al., 1998).

Prokaryonten enthalten wenigstens fünf Familien von Protein-O-Phosphatasen, einschließlich der bifunktionellen AceK, der Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase aus Bakterien, bei

der es sich um die einzige bisher beschriebene Proteinphosphotransferase und -phosphohydrolase in einem Polypeptid handelt (Kennelly und Potts, 1999).

Die Proteinphosphatasen eukaryontischen Typs bestehen aus den beiden biochemisch unterschiedlichen Serin/Threonin Phosphatasefamilien PPP und PPM, sowie der Tyrosin Phosphatasefamilie PTP und den „low molecular weight“ PTP's. Die PPP Familie umfaßt die PP1, PP2A und die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PP2B Phosphatasen, während die PPM Familie die  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige PP2C-Phosphatase enthält (Cohen P., 1989; Wera und Hemmings, 1995). Die Phosphotyrosin-Phosphatasefamilie PTP enthält auch die „dual specificity“ (DSP) Phosphatasen, die sowohl Serin- und Threonin-, als auch Tyrosinreste dephosphorylieren können. Vertreter beider PTP Familien wurden in Bakterien und in Archaea identifiziert, ebenso wie Mitglieder der PPP Familie. In Archaea wurden bisher keine Vertreter der PPM Phosphatasen entdeckt (Shi et al., 1998).

In *Bacillus subtilis*, der über ein ausgeprägtes Netz an Phosphorylierungskaskaden verfügt, sind einige PP2C-Phosphatasen gut charakterisiert und ihre Funktionen in der Zelle sind aufgeklärt. So nutzen z.B. RsbU und RsbP das Substrat RsbV und wirken gemeinsam mit RsbX und dessen Substrat RsbS an der  $\sigma$  B-vermittelten Stressantwort mit (Kennelly et al., 1999; Vijay et al., 2000; Yang et al., 1996). Eine gut charakterisierte, membrangebundene PP2C-Phosphatase ist SpoIIE, die über das Substrat SpoIIAA an der  $\sigma$  F-aktivierten Sporulation beteiligt ist (Adler et al., 1997).

Die Aktivität der 28 kD Phosphatase PrpC wurde *in vitro* gezeigt und als natürliches Substrat die Kinase PrkC, deren Gen *prkC* benachbart zu *prpC* liegt, postuliert. Eine mögliche Funktion *in vivo* ist nicht bekannt (Obuchowski et al., 2000).

Aus *Myxococcus xanthus* ist Pph1, deren Inaktivierung die Aggregation der Zellen zur Fruchtkörperbildung verhindert, *in vitro* charakterisiert. Ein mögliches *in vivo* Substrat ist die Kinase Pkn5. In diesem Organismus, der einen komplexen Lebenszyklus aufweist wurden auch verschiedene Serin/Threonin Proteinkinasen nachgewiesen (Treuner-Lange et al., 2001).

#### 4.2. Protein O-Phosphorylierung in Cyanobakterien

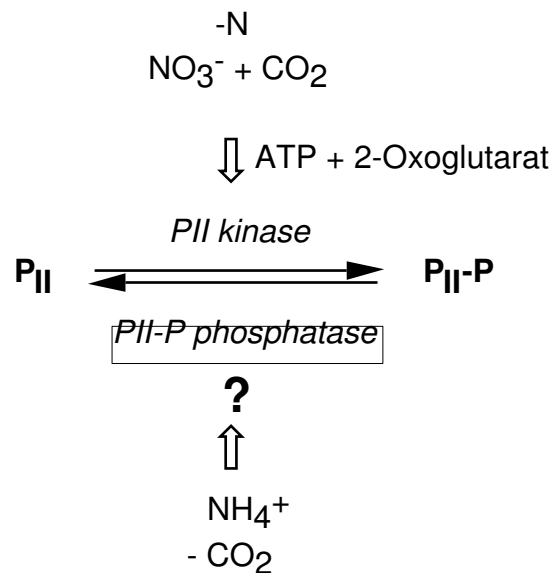
Die Proteinphosphorylierung spielt in Cyanobakterien eine wichtige Rolle bei adaptiven Prozessen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, z.B. bei verschiedenen Beleuchtungen, bei Salzstress, bei der Heterocystenbildung und bei unterschiedlichen Nährstoffangeboten (Sanders et al., 1989; Hagemann et al., 1993; Mann, 1994). In

Cyanobakterien wurden ebenfalls Serin/Threonin und Tyrosin Proteinkinasen und –Phosphatasen identifiziert, z.B. die „Hanks-type“ Kinasen PknA, PknD und PknE aus *Anabaena sp.*, (Zhang und Libs., 1998; Zhang et al., 1998), deren physiologische Rollen aber nicht bekannt sind. Zu den Phosphatasen zählen die „dual specificity“ Phosphatase IphP aus *Nostoc commune* (Potts et al., 1993), die PP1/2A Phosphatasen pp1-cyano2 aus *Microcystis aeruginosa* (Shi et al., 1997) und PrpA aus *Anabaena sp.* (Zhang et al., 1998). Von keiner dieser Phosphatasen sind jedoch die physiologischen Funktionen oder die Substrate bekannt. Die komplette Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis* PCC 6803 zeigte 21 putative Serin/Threonin und Tyrosin Kinasen und Phosphatasen auf. Das ist bisher die größte Anzahl unter den prokaryontischen Genomen und lässt auf komplexe Signaltransduktionen schließen. Erstaunlich viele putative Proteinkinasen befinden sich in der ABC1-Familie, was an der photosynthetischen Energiegewinnung des Organismus liegen könnte (Leonard et al., 1998). Von den putativen PP2C-Phosphatasen aus *Synechocystis* 6803 T wurde die  $Mg^{2+}$  / $Mn^{2+}$ -abhängige Serin/Threonin Phosphataseaktivität von IcfG (*slr1860*) *in vitro* nachgewiesen (Shi et al., 1999). Ein mögliches *in vivo* Substrat (*slr1865*) wurde identifiziert, das interessanterweise mit *icfG* und einer SpoIIAB ähnlichen Kinase, *slr1861*, im *icfG* Gencluster lokalisiert ist. Die genaue physiologische Wirkung von IcfG in der Koordination des Kohlenstoff- und Glukosestoffwechsel ist jedoch nicht bekannt. Eine weitere putative PP2C Phosphatase, RsbU (*slr2031*), könnte mit Nährstoffmangel zu tun haben (Huckauf et al., 2000; Sauer et al., 1999).

## 5. Aufgabenstellung

Als erstes cyanobakterielles Protein, das an einem Serinrest phosphoryliert wird, wurde von Forchhammer und Tandeau de Marsac (1994) in *Synechococcus* PCC 7942 das Signaltransduktionsprotein PII (*glnB*) identifiziert. Die Phosphorylierung und die Dephosphorylierung des PII Proteins in Abhängigkeit des Stickstoff- und Kohlenstoffstoffwechsels, erfolgt durch eine bisher nicht identifizierte Kinase und durch eine  $Mg^{2+}$ -abhängige, putative Serin/Threonin-Phosphatase vom PP2C Typ (Forchhammer und Tandeau de Marsac 1994; Sanner, 1996). Die Dephosphorylierung in permeabilisierten Zellen wird bereits durch ATP gehemmt und die Hemmung wird synergistisch durch 2-Oxoglutarat verstärkt. Es war aber nicht bekannt, wie die Dephosphorylierung in Abhängigkeit von der Stickstoff- und Kohlenstoffversorgung der Zellen reguliert wird und welcher molekulare

Mechanismus zugrunde liegt (Abb. 1). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die PII-P Phosphatase zu reinigen, biochemisch zu charakterisieren und durch *in vitro* Analysen der Dephosphorylierungsreaktion Aufschluß über die Regulation zu erhalten. Die physiologische Analyse einer PII-P Phosphatase-defizienten Mutante sollte zudem zur Aufklärung der Funktion der PII-Phosphorylierung beitragen.



**Abb. 1:** Arbeitsmodell zur Regulation der PII-Phosphorylierung.

## B. Material und Methoden

### 1. Verwendete Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Der verwendete Stamm *Synechocystis* PCC 6803 T ist ein Wildtypstamm mit erhöhter Transformationseffizienz. Die slr und slr Nummern bezeichnen die offenen Leserahmen von *Synechocystis* PCC 6803 gemäß der Cyanobase Datenbank (Kaneko et al., 1996). Tabelle 2 enthält die Nukleotidsequenzen der eingesetzten Oligonukleotide und Tabelle 3 die verwendeten Plasmide.

**Tabelle 1:** Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Literatur
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Wildtyp	Kuhlemeier et al., 1983
<i>Synechococcus</i> PCC 7942 MP2	<i>glnB::kan<sup>R</sup></i>	Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995a
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 T	Wildtyp	Grigorieva und Shestakov, 1982
slr 0114 kan <sup>R</sup>	<i>slr0114:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 1365 kan <sup>R</sup>	<i>sll1365:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 1033 kan <sup>R</sup>	<i>sll1033:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 0602 kan <sup>R</sup>	<i>sll0602:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 1771/5 kan <sup>R</sup>	<i>sll1771:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 1771/17 kan <sup>R</sup>	<i>sll1771:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 1387 kan <sup>R</sup>	<i>sll1387:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 1329 kan <sup>R</sup>	<i>sll1329:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
sll 0135 kan <sup>R</sup>	<i>sll0135:: kan<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS λDE3</i>	Studier und Moffat, 1986

**Tabelle 2:** Nukleotidsequenzen der Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
slr 0114 k.o. 5′	5′-CTAAGCGGTACCGAATGTCC-3′
slr 0114 k.o. 3′	5′-GCTAACATGAGCTCCACGTC-3′
slr1983 k.o. 5′	5′-CATCTAGCCCCGGGCATATCA-3′
slr1983 k.o. 3′	5′-CCAAGAAAATGGTACCAC-3′
sll 0602 k.o. 5′	5′-GGCCATGGTACCGCTTTTATCG-3′
sll 0602 k.o. 3′	5′-GCTAGCGGAGCTCTCATCTAAAC-3′
sll1033 k.o. 5′	5′-GGGGATGGTGTCTAGAAATTAGCG-3′
sll1033 k.o. 3′	5′-CCTACCGAGCTCGTGGAACAG-3′
sll1365 k.o. 5′	5′-GCTGGTACCATTGATTTTGCCC-3′
sll1365 k.o. 3′	5′-CCTAGAGCTCTACGGCAGTG-3′
sll1771 k.o. 5′	5′-CGATCAAGCTTTTCCGTTTCC-3′
sll1771 k.o. 3′	5′-TTACCACTGGCGGAGCTCTCAT-3′
sll1387 k.o. 5′	5′-GCCTACTGGCACCACCAAAA-3′
sll1387 k.o. 3′	5′-GGTCGAAACTTCCGCAAGCT-3′
sll1329 k.o. 5′	5′-GCCATTCCCAAGGGAGAAAAAG-3′
sll1329 k.o. 3′	5′-GCACGTAGAGCAAACCTGAATTC-3′
revers	5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′
universal	5′-GTAAAACGACGGCCAGT-3′
5′sll 1771	5′-CCAATTTTCTAAGGCATATGACA-3′
3′sll 1771	5′-CTTCCCGGGTACTAAATCTAT-3′



**Tabelle 3:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Literatur
pBluescriptIIKS+	<i>amp<sup>R</sup> lacZ</i>	Stratagene
pUC19	<i>amp<sup>R</sup> lacZ</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
pT7-7	<i>amp<sup>R</sup></i>	Tabor und Richardson, 1985
pUC4-KIXX	<i>lacZ kan<sup>R</sup> bleo<sup>R</sup></i>	Pharmacia
pUC4-KIND	<i>lacZ kan<sup>R</sup></i>	Pharmacia
pUC4-KAPA	<i>lacZ kan<sup>R</sup></i>	Pharmacia
pUC4-KISS	<i>lacZ kan<sup>R</sup></i>	Pharmacia
pslr 0114	pBlue <sup>a</sup> + <i>slr0114</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
psll0602	pBlue <sup>a</sup> + <i>sll0602</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
psll 1033	pUC19 + <i>sll1033</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
psll 1365	pBlue <sup>a</sup> + <i>sll1365</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
psll1771	pUC19 + <i>sll1771</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
psll1387	pBlue <sup>a</sup> + <i>sll1387</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
psll1329	pUC19 + <i>sll1329</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
psll 0135	pUC19 + <i>sll0135</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pslr 1983	pBlue <sup>a</sup> + <i>slr1983</i> aus <i>S.cystis</i> 6803 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pslr 0114 kan <sup>R</sup>	pslr 0114 + KIND	diese Arbeit
psll 0602 kan <sup>R</sup>	psll 0602 + KAPA	diese Arbeit
psll 1033 kan <sup>R</sup>	psll 1033 + KISS	diese Arbeit
psll 1365 kan <sup>R</sup>	psll 1365 + KIXX	diese Arbeit
psll 1771/5 kan <sup>R</sup>	psll 1771/5 + KISS	diese Arbeit
psll 1771/17 kan <sup>R</sup>	psll 1771/17 + KISS	diese Arbeit
psll 1387 kan <sup>R</sup>	psll 1387 + KIXX	diese Arbeit
psll1329 kan <sup>R</sup>	psll 1329 + KIXX	diese Arbeit
pslr 1983 kan <sup>R</sup>	pslr1983 + KAPA	diese Arbeit

pBlue<sup>a</sup>, pBluescriptIIKS+  
*S.cystis* 6803<sup>b</sup>, *Synechocystis* PCC 6803

## 2. Kultivierung von Bakterien

### 2.1. Anzucht von Cyanobakterien

Die Wildtypstämme *Synechocystis* PCC 6803 T und *Synechococcus* PCC 7942, sowie die Mutanten wurden in Flüssigkulturen photoautotroph bei 25°C und einer konstanten Beleuchtung von 50 µE (Osram Lumilux de Luxe) angezogen. Um eine optimale Belüftung zu erhalten wurden die Kulturen in Schikanekolben, die zu 1/10 des Volumens mit Medium befüllt waren und mit Silikon-Kulturkappen (Bellco Glass Inc. NJ) bedeckt wurden, schüttelnd bei 100 rpm inkubiert. Die Anzucht mit der Stickstoffquelle Nitrat erfolgte in BG11<sup>N</sup> Medium, welches 17,6 mM NaNO<sub>3</sub> enthält, bei Verwendung von Ammonium (BG11<sup>A</sup>) wurde Nitrat durch 5 mM NH<sub>4</sub>Cl ersetzt und mit 20 mM Hepes pH 7,8 gepuffert (Rippka R., 1988). Zur Aufrechterhaltung der Mutation in den Mutanten wurde 50 µg/ml Kanamycinsulfat zugegeben. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei OD<sub>750</sub> in einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Pharmacia) verfolgt.

Um Stickstoffmangel zu erreichen, wurden die Zellen bei einer optischen Dichte (OD<sub>750</sub>) von 0,4 bei Raumtemperatur (RT) durch 10 min Zentrifugation bei 3000g sedimentiert, in derselben Menge BG11 Medium ohne Stickstoffquelle resuspendiert und unter denselben Bedingungen wie vorher weiterinkubiert.

Ammoniumshock wurde durch Zugabe von 5 mM NH<sub>4</sub>Cl zu Nitrat gewachsenen Zellen erreicht.

Um Zellen in ammoniumhaltiges Medium zu überführen, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei RT sedimentiert und nach einmaligem Waschen mit BG11<sup>A</sup>, in diesem Medium resuspendiert und wie zuvor weiterinkubiert

Die Anzucht der Zellen unter limitierten CO<sub>2</sub>-Bedingungen erfolgte in BG11<sup>N</sup> Medium, dem kein NaHCO<sub>3</sub> zugesetzt worden war. Die Kulturen wurden in vollständig befüllten Schraubflaschen stehend bei 20 µE Beleuchtung inkubiert. Einmal am Tag wurden die Zellen vorsichtig aufgeschüttelt.

Zur Anzucht auf festen Nährmedien wurde BG11<sup>N</sup> Medium mit 0,9 % (w/v) Gelrite (Roth, Karlsruhe) verfestigt.

## 2.2. Anzucht von *Escherichia coli*

*E.coli* wurde aerob bei 37°C in LB Komplexmedium (Miller, 1992) kultiviert, wobei Antibiotika und Supplemente in den üblichen Konzentrationen verwendet wurden (Sambrook et al., 1989). *E.coli* Zellen, die Plasmide mit dem *lac*-Promoter trugen, wurden, außer für Überexpressionen, in Anwesenheit von 1 % Glukose vermehrt.

Die Massenzunahme wurde durch Messung der OD<sub>600</sub> verfolgt.

## 3. Analytische Methoden

Um den Chlorophyll a – und den Phycobiliproteingehalt von Kulturen abschätzen zu können, wurden Absorptionsspektren von 350 bis 750 nm an einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Pharmacia) erstellt.

Der Glykogengehalt der Zellen wurde mit Schwefelsäure und Toluidinlösung, wie bei Görl et al., (1998) beschrieben, ermittelt.

Die Konzentration von Nitrit im Kulturüberstand wurde durch einen Farbttest mit Sulfanilsäure und  $\alpha$ -Naphthylamin photometrisch bestimmt (Snell et al., 1949).

## 4. Physiologische Tests

### 4.1. *In vivo* Markierung mit [<sup>32</sup>P] Orthophosphat

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen in BG11<sup>N</sup> Medium mit 1 % NaCl, um die Schleimbildung zu reduzieren, bis zu einer OD<sub>750</sub> von 0,5 angezogen, bei RT einmal in BG11<sup>N</sup> Medium mit 1 % NaCl ohne Phosphat gewaschen und zu einer OD<sub>750</sub> von 2 in demselben Medium resuspendiert und weiterinkubiert. Nach einer Anpassungszeit von 1,5 h wurden die Zellen mit 5  $\mu$ Ci/ ml mit [<sup>32</sup>P] Orthophosphat für 3 h markiert. Zur Beendigung der Markierung wurden je 2 OD Zellen in Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff für 5 s abgekühlt. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 14000g und 4 °C wurde das Zellpellet dreimal mit eiskaltem 80 %-igem (v/v) Aceton gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die Zellen wurden in 20  $\mu$ l 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 95 °C in 5 min lysiert. Die Zelltrümmer wurden 5 min bei 14000g und RT abzentrifugiert und die

gelösten Proteine wurden durch SDS-PAGE in einem Gradienten von 10 – 18 % Polyacrylamid aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Pall-Filtron) transferiert und mit Röntgenfilmen exponiert.

#### **4.2. Messung der Glutaminsynthetase-Aktivität**

Die Gesamtaktivität der Glutaminsynthetase wurde in permeabilisierten Zellen in Anwesenheit von  $Mn^{2+}$  durch die Bildung von  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat (GS-Transferasetest) bestimmt. Die physiologische Wirksamkeit der Glutaminsynthetase wurde mittels des biosynthetischen GS-Tests durch die Bildung von Glutamin bestimmt. Die Reaktionen wurden wie bei Görl (1997) beschrieben, durchgeführt.

#### **4.3. Bestimmung der Nitrat- und Nitritreduktaseaktivität**

Die Aktivität der Nitrat- und Nitritreduktase wurde in permeabilisierten Zellen mit Dithionit-reduziertem Methylviologen als Reduktionsmittel bestimmt. Die Tests wurden, wie bei Herrero und Guerrero (1986) beschrieben, durchgeführt.

#### **4.4. *in vivo* Dephosphorylierung von PII-P**

Um die Dephosphorylierung von PII-P von Wt und Mutantenzellen *in vivo* zu bestimmen, wurden die Zellen unter Standardbedingungen in BG11<sup>N</sup> Medium angezogen. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden bei einer  $OD_{750}$  von 0,5, nach Entnahme des  $t_0$  Wertes mit den entsprechenden Reagenzien versetzt, gemischt und unter sonst unveränderten Bedingungen weiterinkubiert. Pro Versuchszeitpunkt wurden Proben von 2 ml entnommen, 5 s in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und für 2 min bei 14000g und 4°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bei –20 °C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

#### **4.5. Nitrat - abhängige O<sub>2</sub> Entwicklung**

Zur Messung der Nitrat - abhängigen O<sub>2</sub> Entwicklung wurden die Zellen in BG11<sup>N</sup> Medium kultiviert, in BG11 Medium ohne Stickstoffquelle gewaschen und zu einer OD<sub>750</sub> von 1 resuspendiert. Nach 2 h Adaptation unter sonst unveränderten Bedingungen, wurde die O<sub>2</sub> Messung von 1 ml Zellen wie bei Forchhammer und Tandeau de Marsac (1995a) beschrieben, mit einer „Clark-type“ Elektrode in einer Sauerstoffmeßeinheit (Hansatech LD2, Bachofer) durchgeführt. Statt 17,5 mM wurden hier nur 10 mM Natriumnitrat zugegeben und die Beleuchtungsstärke betrug 260 µE.

### **5. Biochemische Methoden**

#### **5.1. Standardmethoden**

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch SDS-PAGE in 12,5 %-igen Gelen oder in Gradientengelen von 10 – 18 % Polyacrylamidgehalt nach Laemmli (1970).

Unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden die Proteine elektrophoretisch nach der von Forchhammer und Tandeau de Marsac (1994) beschriebenen Methode in 7,5 %-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine durch das „semi-dry“ Blotverfahren bei 12 V bzw. 20 V konstanter Spannung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert oder wurden durch Coomassie- oder Silberfärbung (Blum et al., 1987) im Gel detektiert.

#### **5.2. Analyse des Phosphorylierungsgrades von PII**

Um den *in vivo* Phosphorylierungsgrad von PII aus ganzen Zellen zu bestimmen, wurden Kulturproben in Reaktionsgefäße überführt, sofort für 5 s in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und 2 min, 14000g bei 4 °C pellettiert. Die Zellen wurden in 200 µl eiskaltem

Zellaufbruchpuffer (50 mM Tris/Cl, pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin) resuspendiert und durch Ultraschallpulse (Irmeler, 1997) aufgebrochen. Wahlweise erfolgte der Aufbruch nach Zugabe 1 Volumenteils Glasperlen und Übersichtung mit Zellaufbruchpuffer in verschraubbaren Reaktionsgefäßen durch ein Schüttelgerät in 3 x 20 s, Stufe 5 (Ribolyser, Hybaid-AGS, Heidelberg).

Vom Rohextrakt wurde ein Volumen, das 5 µg Protein entspricht (oder der Gesamtansatz des *in vitro* Phosphataseassays, 5.4.) unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die vier möglichen Isoformen des PII Proteins wurden durch Immunoblotanalyse mit PII-spezifischen Antikörpern detektiert (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994).

### **5.3. Reinigung von Proteinen**

Alle Proteinreinigungen wurden bei 0-4°C durchgeführt. Die Superdex 200 Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60, Pharmacia) wurde mit folgenden Referenzproteinen kalibriert: Rinderalbumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carboanhydrase (29 kD), Lysozym (14 kD).

#### **5.3.1. Reinigung von phosphoryliertem PII (PII-P)**

Phosphoryliertes PII Protein wurde nach der in der vorangehenden Diplomarbeit (Irmeler, 1997) etablierten Methode aus *Synechococcus* PCC 7942 Zellen wie beschrieben (Irmeler et al., 1997) hergestellt und gereinigt, mit folgenden Änderungen: die Zellen wurden in BG11 Medium mit einem reduzierten Nitratgehalt von 1 mM bis zu einer OD<sub>750</sub> von 0,9 angezogen, wodurch eine beginnende Chlorose und damit ein maximaler Phosphorylierungsgrad von PII erreicht wurde; die Entwicklung der Heparin Säule wurde mit einem linearen Salzgradienten von 200 ml durchgeführt; das gereinigte PII-P wurde aliquotiert und in einem Lagerpuffer aus 10 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,5 mM EDTA und 50 % Glycerin bei -70°C aufbewahrt.

### 5.3.2. Herstellung des teilgereinigten PII-P Phosphatase-Extraktes aus MP2 Zellen

Teilgereinigter PII-P Phosphatase-Extrakt wurde aus der PII-defizienten Mutante MP2 hergestellt. Die Zellen wurden in BG11<sup>N</sup> Medium bis zu einer OD<sub>750</sub> von 0,8 kultiviert, geerntet, in Zellaufbruchpuffer (50 mM Tris/Cl, pH 7,4; 100 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch eine French Press-Zelle bei 13000 psi, aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min 10000g und 20 min 30000g) entfernt. Der Überstand (S30) wurde 1 h bei 100000g ultrazentrifugiert. Der erhaltene Überstand (S100) wurde auf eine 50 % Ammoniumsulfat-Sättigung eingestellt, wodurch auch die PII-Phosphatase präzipitierte. Das Präzipitat wurde resuspendiert (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT, 2 mM Benzamidin; 0,5 mM EDTA) und auf eine in denselben Puffer äquilibrierte Superdex 200 Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60, Pharmacia) aufgetragen. Die Fraktionen wurden auf PII-P Phosphataseaktivität, wie in 5.4.1. beschrieben, getestet. Phosphatasehaltige Fraktionen wurden vereinigt und einer Anionenaustauscher-Chromatographie an einer 5 ml Econo-Pac High Q Säule (BioRad) mit einem 100 ml Gradienten von 50 bis 750 mM KCl in oben genanntem Puffer, unterzogen. Phosphatasehaltige Fraktionen wurden durch Ultrafiltration (Nanosept Filtron, 10 K) auf 0,2 µg/µl aufkonzentriert und bei -20 °C aufbewahrt.

### 5.3.3. Reinigung der PII-P Phosphatase, PphA, aus *Synechocystis* PCC 6803 nach Überproduktion in *E.coli*

#### Überproduktion von PphA

Der offene Leserahmen von *sll1771* wurde mittels der Oligonukleotide 5' sll1771 (enthält eine *NdeI* Schnittstelle) und 3' sll1771 (enthält eine *SmaI* Schnittstelle) mit Hilfe der Taq-Polymerase amplifiziert und über die *NdeI* Schnittstelle „in frame“ in das ATG Startcodon des Expressionsvektors pT7-7 kloniert. Das Konstrukt wurde kontrollsequenziert und in *E.coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Zur Überproduktion von PphA wurden die Zellen in 1 l LB Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion zugesetzt waren, angezogen. Bei Erreichen einer optischen Dichte der Kultur von einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Expression des *pphA* Gens mit 1 mM IPTG induziert. Die Ernte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,9 nach 4 h Induktion ergab 3,3 g Zellfrischgewicht. Das überproduzierte Protein war in mit Coomassie

gefärbten SDS-Gelen gut erkennbar, so daß die Reinigung durch Identifizierung dieser 34 kD Bande in den verschiedenen Fraktionierungsschritten erfolgte.

### **Reinigung der überproduzierten PphA**

Zur Reinigung der überexprimierten PphA wurden die erhaltenen 3,3 g Zellen in 6 ml Zellaufbruchpuffer (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 3 mM DTT; 1 mM Benzamidin; 0,2 mM PMSF) resuspendiert und mit Ultraschallpulsen aufgebrochen. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden durch drei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte entfernt (15 min bei 10000g = S10; 20 min bei 30000g = S30; 1 h bei 100000g = S100). Der S100 Überstand wurde mit Ammoniumsulfat auf 60 % Sättigung eingestellt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min bei 10000g) geerntet, in 2 ml Puffer II (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 3 mM DTT; 1 mM Benzamidin) resuspendiert und nach Dialyse gegen denselben Puffer auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte DEAE Sepharose Anionenaustauscher-Chromatographiesäule (23 ml; Fast flow; Amersham Pharmacia) aufgetragen. Die Elution wurde mit einem linearen 50 ml Gradienten von 50 – 550 mM KCl durchgeführt und die PphA enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mit 50 % Ammoniumsulfat präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 1,5 ml Puffer II resuspendiert und nach Dialyse gegen denselben Puffer auf eine 1,3 ml UnoQ Anionenaustauschersäule (BioRad) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem linearen 35 ml Gradienten von 200 – 550 mM KCl eluiert. PphA enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und die Proteine wurden mit 80 % Ammoniumsulfat präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 2 ml Puffer III (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 3 mM DTT; 1 mM Benzamidin; 30 % Ammoniumsulfat) resuspendiert, gegen denselben Puffer dialysiert und auf eine 5 ml Methyl HIC Econo-Pac hydrophobe Interaktionschromatographiesäule (BioRad) aufgetragen. Die Säule wurde mit einem linearen 50 ml Gradienten von 30-0 % Ammoniumsulfat in Puffer III entwickelt. PphA enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und die Proteine wurden mit 80 % Ammoniumsulfat präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 800 µl Puffer IV (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 3 mM DTT; 1 mM Benzamidin) resuspendiert und auf eine in demselben Puffer eingespülte Superdex 200 Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 (Pharmacia) aufgetragen. PphA eluierte in einem einzigen Peak und wurde in Lagerpuffer (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 50 % Glycerin ) dialysiert und



aliquotiert bei – 20 °C aufbewahrt. Für die Bestimmung der  $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Abhängigkeit der PphA wurde das gereinigte Enzym in Lagerpuffer ohne  $\text{MgCl}_2$  dialysiert und wie oben aufbewahrt.

#### **5.4. *in vitro* Aktivitätstests der PII-P Phosphatase PphA**

##### **5.4.1. Dephosphorylierung von PII-P**

Die Aktivität der PII-P Phosphatase in Rohextrakten, in verschiedenen Reinigungsfraktionen und die Aktivität des gereinigten Enzyms wurde anhand der Dephosphorylierung von gereinigtem, phosphoryliertem PII Protein ermittelt.

- a) 130 ng des teilgereinigten PII-P Phosphataseextraktes aus MP2 Zellen wurden in 15 µl 50 mM Tris/Cl, pH 7,4, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  mit 40 ng gereinigtem phosphoryliertem PII Protein bei 37 °C für die jeweils angegebene Zeit inkubiert.
- b) 3 bis 10 ng der überproduzierten und gereinigten PII-P Phosphatase, PphA, aus *Synechocystis* PCC 6803 wurden mit 14 ng gereinigtem phosphoryliertem PII Protein in 10 µl 10 mM Tris/Cl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin, 0,05 % NP40 und 10 % BSA bei 37 °C für die jeweils angegebene Zeit inkubiert.

Die Reaktionen wurden in flüssigem Stickstoff gestoppt und der Phosphorylierungsgrad von PII wurde durch nicht-denaturierende PAGE und Immunoblotanalyse (siehe 5.2.) bestimmt.

##### **5.4.2. Dephosphorylierung von P-Casein, P-Histonen und P-Kemptid**

###### **Herstellung der phosphorylierten Substrate**

Die Herstellung der [ $^{32}\text{P}$ ] markierten Substrate erfolgte prinzipiell wie bei Kennelly et al (1993) beschrieben. In einem 200 µl Ansatz wurden 100 µg Casein, Kemptid oder Histone mit [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]- ATP und 0,1 mM ATP (40 µCi /20 nmol ATP) durch 5 U Proteinkinase A (c.s.) in 50 mM Tris/Cl, pH 7,0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 5 mM DTT über Nacht bei 30 °C phosphoryliert. P-Casein und P-Histone wurden durch Gelfiltrationschromatographie über eine Sephadex G-25 Säule in 10 mM Tris/Cl, pH 7,0, 0,5 mM EDTA, 2 mM DTT von nicht

gebundenem ATP und Pi getrennt. P-Kemtid wurde durch Anionenaustauscher-Chromatographie über eine UnoQ Säule (160 µl, BioRad) in 30 % Essigsäure von ungebundenem ATP und Pi befreit, lyophilisiert und in 5 mM Hepes Puffer, pH 7,0 resuspendiert (Howell et al., 1996). Um die Fraktionen, welche die phosphorylierten Substrate enthielten, zu identifizieren, wurde von den erhaltenen Fraktionen die Einbaurate von [ $\gamma$ - $^{32}$ P] bestimmt. Dazu wurde die Radioaktivität von 10 µl Aliquots direkt und nach Fällung der Proteine mit 10 % (w/v) TCA im Überstand durch Scintillationsmessung bestimmt, wobei die Differenz der eingebauten Radioaktivität entspricht.

Die Fraktionen, die phosphoryliertes Protein enthielten, wurden bei 4°C aufbewahrt.

### **Dephosphorylierung von P-Casein, P-Histonen und P-Kemtid**

Die Dephosphorylierung der [ $^{32}$ P] markierten Substrate P-Casein, P-Histone und P-Kemtid wurde in 25 µl 50 mM Tris/Cl, pH 7,4, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 125 µl eiskaltem Stoppmix (0,9 mM HCl, 90 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 % (w/v) Norit A) gestoppt. Die Probe wurde 10 s gemixt, 4 min bei 14000g zentrifugiert und das freigesetzte Pi wurde in 75 µl des Überstandes durch Scintillationsmessung bestimmt (Kennelly et al., 1993).

## **6. Immunologische Methoden**

Immunoblot-Analysen wurden wie in der vorangegangenen Diplomarbeit (Irmeler, 1997) beschrieben, durchgeführt, wobei die Absättigung der Membran und die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern nun bei RT erfolgte. Folgende Verdünnungen der primären Antikörper wurden eingesetzt: Anti-P<sub>II</sub>, 1:10000; Anti-GlnA, Anti-GlnN und Anti-RbcL, 1:5000. Anti-GlnN-spezifische Antikörper waren gegen GlnN aus *Synechocystis* PCC 6803 gerichtet und wurden von Dr. F.J. Florencio zur Verfügung gestellt. Anti-GlnA-spezifische Antikörper waren gegen die Glutaminsynthetase aus *Nostoc* sp Stamm UCD 7801 (identisch mit *Nostoc punctiforme*) gerichtet und wurden von Dr. J.C. Meeks zur Verfügung gestellt. Anti-P<sub>II</sub>-spezifische Antikörper waren gegen P<sub>II</sub> von *Synechococcus* PCC 7942 gerichtet.

## 7. Molekularbiologische Methoden

### 7.1. Standardmethoden

Standardmethoden wie die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen, Präzipitation von DNA und die Entfernung der 5' Phosphatgruppen wurden nach Sambrook et al., (1989) und Ausubel et al., (1997) durchgeführt. Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen und die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte nach Angaben der Hersteller. Standardpuffer wie TE und TBE wurden nach Sambrook et al., (1989) hergestellt. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der TELT Methode (He et al., 1990) oder mit Hilfe von Plasmid-Präparations-Kits (Macherey und Nagel, Minden; Quiagen, Hilden). Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit der DEAE Methode nach Grivitz et al., (1980), oder mit einem Gel-Extraktions-Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt.

*E.coli* Zellen wurden durch Elektroporation (Fiedler und Wirth, 1988) oder nach der RbCl-Methode (Hanahan, 1985) mit Plasmid-DNA transformiert.

Die Transformation von *Synechocystis* PCC 6803 T wurde nach der Methode von Golden et al. (1987) durchgeführt, wobei die transformierten Zellen zunächst bei einer Kanamycinkonzentration von 30 µg/ml und nach 2 Passagen bei 50 µg/ml selektioniert wurden.

Genomische DNA aus *Synechocystis* PCC 6803 T wurde nach der von Golden et al. (1987) beschriebenen Methode oder mit dem Kit zur Isolierung genomischer DNA von Quiagen (Hilden) isoliert.

### 7.2. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde nach den Empfehlungen von Boehringer (Mannheim) vorgegangen. Die Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen in einem Personal Cyclyer (Biometra), einem DNA Thermal Cyclyer (Perkin Elmer, USA) oder einem PCR Sprint (Hybaid-AGS, Heidelberg) Gerät mit je 0,01-0,02 U/µl Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim) oder Goldstar-Polymerase (Eurogentec, Belgien) in dem

vom Hersteller gelieferten Puffer, durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 200 nM, Desoxynukleotide in einer Konzentration von 100µM zugesetzt. Als DNA-Matrize wurde 1-3 pg Plasmid-DNA oder 10-20 ng chromosomale DNA eingesetzt. Zur Amplifikation von DNA aus ganzen Zellen, wurde sehr wenig Zellmaterial eines Reinigungsausstriches in ein Reaktionsgefäß gebracht und durch 90 s Erhitzen in der Mikrowelle (600 W) vor Zugabe des restlichen Reaktionsgemisches aufgebrochen.

### 7.3. Herstellung der Insertionsmutanten

Mutanten von *Synechocystis* PCC 6803 T, die in definierten, putativen Phosphatasegenen defekt waren, wurden mit Hilfe der reversen Genetik hergestellt. Dazu wurden die codierenden Sequenzen und benachbarte Sequenzen mit einer Gesamtlänge von ca. 2,5,kB über PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden aus der Genomsequenz von *Synechocystis* PCC 6803 (Kaneko et al., 1996) abgeleitet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in pBluescriptIIS oder in pUC19 Vektoren kloniert und in *E.coli* DH5α transformiert. Die inserierten Fragmente wurden zur Kontrolle sequenziert und in die codierende Region eines korrekten Konstruktes wurde über eine singuläre Restriktionsschnittstelle das *aphII* Gen (Aminoglycosid-Phosphotransferase II) aus pUC4 (Pharmacia), das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, eingesetzt. Nach Transformation in *E.coli* DH5α und Selektion auf Kanamycinresistenz, wurde ein korrektes Konstrukt in *Synechocystis* PCC 6803 T transformiert. Die Segregation der Mutation wurde durch mehrmaliges Ausstreichen auf BG11<sup>N</sup> Platten, die zuerst mit 30 µg/ml und dann mit 50 µg/ml Kanamycin supplementiert wurden, erreicht. Die komplette Segregation der Mutation in transformierten *Synechocystis* PCC 6803 T Zellen wurde durch PCR aus ganzen Zellen und durch Southern-Blot Analyse nachgewiesen.

### 7.4. Southern-Blot Analysen

Nach der Restriktion der chromosomalen DNA mit geeigneten Endonukleasen und elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen, wurden die DNA-Fragmente nach der Methode von Southern (1975) auf eine Nitrocellulosemembran (Pall Filtron) transferiert und durch UV Licht kovalent an die Membran gebunden. DNA-Fragmente wurden nach

Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden, die mittels des Megaprime labelling Systems (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  markiert wurden, im Autoradiogramm detektiert.

### 7.5. Isolierung von RNA und Northern-Blot Analysen

Um RNA zu isolieren, wurden *Synechocystis* PCC 6803 T und MPphA Zellen bis zu einer  $\text{OD}_{750}$  von 0,5 in BG11<sup>N</sup> und BG11<sup>A</sup> Medium kultiviert. Zur Ernte wurden je 35 ml Zellen in flüssigem Stickstoff schockgekühlt, 10 min bei 8000g und 4 °C sedimentiert und bei –70°C aufbewahrt. Die Extraktion der RNA erfolgte mit heißem, saurem Phenol (Aiba et al., 1981) nach der von Maier (1997) modifizierten Methode.

Northern-Blot Analysen wurden prinzipiell wie von Sauer (2001) beschrieben, durchgeführt. 30 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel mit 2,2 M Formaldehyd aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (Nytran NY 12 N, Schleicher& Schuell) transferiert. Die spezifische DNA Sonde wurde mit Hilfe des Megaprime labelling Kits (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  markiert und anschließend von nicht gebundenem  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  gereinigt (PCR purification Kit, Quiagen, Hilden).

### 8. Bezugsquellen

Enzyme für die Molekularbiologie wurden von den Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Amersham Pharmacia (Freiburg), Promega (Mannheim) und Sigma (München) bezogen. Radiochemikalien stammten von NEN-Dupont (Dreieich) und Amersham Pharmacia (Freiburg). Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) synthetisiert. Feinchemikalien wurden von BioRad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco (Madison, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Säulen und Ausrüstung für die Proteinreinigungen stammten von Amersham Pharmacia (Freiburg) und von Biorad (München).

## 9. Datenverarbeitung

Die Suche nach Proteinen mit Ähnlichkeit zur Sequenz von PphA wurde über Internet am „National Institute of Health“ (<http://www.ncbi.nlm.gov>) als BLASTP Analyse (Altschul et al., 1997) durchgeführt. Die Sequenzen von *Nostoc* sp. und *Anabaena* sp. wurden über W.I.T. (<http://IntegratedGenomics.com/Gwit/CGI/simsearch.cgi>) erfasst. Die Sequenzvergleiche wurden mit CLUSTALX (Thompson et al., 1997) durchgeführt. Die Proteinsequenzen für den phylogenetischen Stammbaum wurden mit den Programmen PHYLIP Version 3.5.7.2. und CLUSTALX (Thompson et al., 1997) analysiert.

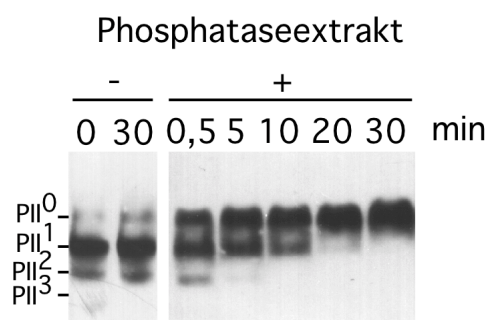
## C. Ergebnisse

### 1. *In vitro* Analysen von teilgereinigten PII-P Phosphatase-Extrakten aus *Synechococcus* PCC 7942

Das Signaltransduktionsprotein PII wird in Abhängigkeit der Kohlenstoff- und Stickstoffversorgung der Zellen durch Phosphorylierung modifiziert. Physiologische Studien bei *Synechococcus* PCC 7942 wiesen bereits darauf hin, daß die Dephosphorylierung von PII-P durch Metaboliten des C- und N-Stoffwechsels reguliert werden könnte. *In situ* wurde gezeigt, daß 2-Oxoglutarat und ATP einen synergistischen Hemmeffekt aufweisen (Irmeler, 1997). Durch *in vitro* Analysen sollte nun mit teilgereinigtem PII-P Phosphatase-Extrakt, der aus dem PII-defizienten Stamm MP2 hergestellt wurde, die Regulation der Dephosphorylierungsreaktion näher untersucht werden.

#### 1.1. *in vitro* PII-P Dephosphorylierung

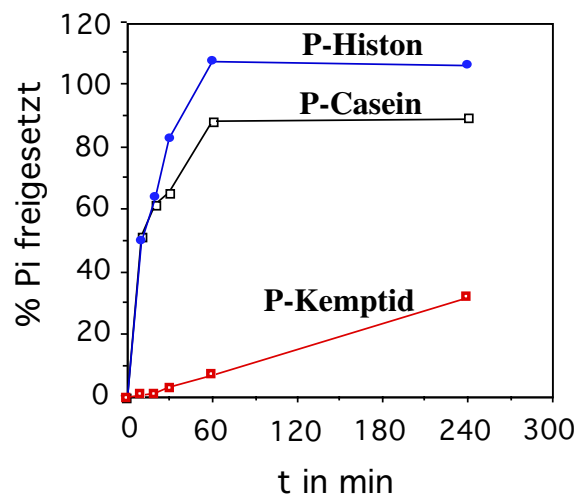
*In vitro* wird gereinigtes, phosphoryliertes PII-P Protein durch teilgereinigten Phosphataseextrakt aus MP2 Zellen in Anwesenheit von 10 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 37°C dephosphoryliert. Der PII Modifikationszustand wird nach nicht-denaturierender PAGE durch Immunoblotanalyse detektiert. Abb. 2 zeigt eine vollständige Dephosphorylierung von PII-P in Anwesenheit, aber nicht in Abwesenheit des Phosphataseextraktes innerhalb von 30 min. Ohne  $\text{Mg}^{2+}$  ist keine Aktivität nachweisbar und sie nimmt mit steigender  $\text{Mg}^{2+}$  Konzentration bis 10 mM zu (Sanner S., Diplomarbeit, 1996). Die  $\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit ist typisch für PP2C-Phosphatasen.



**Abbildung 2:** *In vitro* Analyse der PII-P Phosphataseaktivität. Zeitkinetik der Dephosphorylierung von 40 ng PII-P durch einen Phosphataseextrakt (S100) aus MP2 bei 37°C in Anwesenheit von 10 mM  $\text{MgCl}_2$ .

## 1.2. Substratspektrum der PII-P Phosphatase

Serin/Threonin-Proteinphosphatasen weisen eine breite und teilweise überlappende Substratspezifität *in vitro* auf, die *in vivo* möglicherweise noch größer ist. Ein typisches Substrat der eukaryontischen PP2C Phosphatasen *in vivo* und *in vitro* stellt Phospho-Casein dar (Cohen P., 1989). Um die Substratspezifität der PII-P Phosphatase zu bestimmen, wurden je 130 ng einer teilgereinigten, circa 150-fach angereicherten Enzympräparation (HighQ Extrakt) eingesetzt. Als Substrate wurden Serin/Threonin phosphorylierte Proteine verwendet, wie Casein, gemischte Histone H2A/H2B und das Oligopeptid Kemptid, in einem Reaktionspuffer, der 5 mM  $Mg^{2+}$  und 2 mM  $Mn^{2+}$  enthält. Wie die Enzymkinetiken in Abb.3 zeigen, werden die großen Proteine P-Casein und P-Histone sehr schnell dephosphoryliert, während P-Kemptid circa 50-mal langsamer und ATP (nicht gezeigt) überhaupt nicht dephosphoryliert werden. Die Umsatzraten wurden für PII-P auf  $112 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  Enzym, für Phosphocasein auf  $140 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und für Phosphohistone auf  $88 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  berechnet.



**Abbildung 3:** Substratspezifität eines teilgereinigten Phosphatase-Extraktes (HighQ Extrakt). Die Aktivität ist in % zur Positiv Kontrolle, Alkalische Phosphatase, angegeben.

Bei der Präparation des teilgereinigten PII-P Phosphatase-Extraktes (HighQ) wurden durch die vorausgehende Superdex 200 Gelfiltrationschromatographie (HiLoad 16/60) die



Phosphatase- und die Kinaseaktivitäten voneinander getrennt (Dierks, 1997). In dem weiterverwendeten Phosphataseextrakt ist keine Kinaseaktivität mehr nachweisbar.

### **1.3. Hemmung der Phosphataseaktivität**

Phosphatasen können spezifisch durch Inhibitoren in ihrer Aktivität gehemmt werden. Die Hemmung ist charakteristisch für den jeweiligen Phosphatasetyp und kann zu deren Differenzierung herangezogen werden. Potentielle Inhibitoren von Proteinphosphatasen wurden deshalb in ihrer Wirkung auf die Dephosphorylierung von PII-P und von Phosphocasein getestet (Tab. 4 A). Die Inhibitoren von Alkalischen Phosphatasen, Tetramisol, von Sauren Phosphatasen, Tartrat, von PP1/2A Phosphatasen, Okadaic Acid und von Tyrosin Phosphatasen, Vanadat, haben keine signifikanten Hemmwirkungen auf die PII-P Phosphatase, weder mit PII-P noch mit Phosphocasein als Substrat. Der Breitspektrum-Phosphatase-Inhibitor Kaliumfluorid dagegen reduziert die Aktivität auf ein Drittel bis ein Viertel. 10 mM EDTA hemmen komplett durch die Chelatierung der absolut notwendigen  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  Kationen.

Auch Phosphationen hemmen völlig die Enzymaktivität, was durch den katalytischen Mechanismus der PP2C-Phosphatasen bedingt ist, bei dem das freigesetzte Produkt Pi einen kompetitiven Inhibitor zum Substrat darstellt (Fjeld et al., 1999).

Diese Hemmungen der PII-P Phosphatase sind unabhängig von der Art des Substrates und die Hemmeffekte sind auf eine direkte Einwirkung auf das Enzym zurückzuführen. Das Inhibitions muster entspricht demjenigen von PP2C -Phosphatasen.

**Tabelle 4:** **A** Wirkung von potentiellen Inhibitoren von Proteinphosphatasen auf 130 ng eines teilgereinigten PII-P Phosphatase-Extraktes (HighQ) mit PII-P und Phosphocasein als Substraten. **B** Effekt von ATP und 2-Oxoglutarat auf die Dephosphorylierung von PII-P und Phosphocasein.

**A**

Inhibitor	Konzentration	Aktivität (%Kontrolle) gegen	
		PII-P	Phosphocasein
Kontrolle		100	100
Kaliumfluorid	50 mM	36	23
Tetramisol	1 mM	100	84
Ocadaic acid	1 µM	100	98
Natriumorthovanadat	1 mM	100	93
Natriumtartrat	10 mM	100	80
EDTA	10 mM	2	<1

**B**

Zugabe	Konzentration	Aktivität (% Kontrolle) gegen	
		PII-P	Phosphocasein
ATP	0,25 mM	100	94
2-Oxoglutarat	0,5 mM	100	87
ATP + 2-Oxoglutarat	0,25 mM 0,5 mM	5	94

### **Synergistische Hemmung der PII-P Dephosphorylierung durch ATP und 2-Oxoglutarat**

Um die Regulation der PII-P Phosphataseaktivität durch Komponenten des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels zu erfassen, wurde die Auswirkung von Metaboliten des GS-GOGAT Weges auf die Dephosphorylierung untersucht. Wie in Tab. 4 B dargestellt, zeigen 0,25 mM ATP und 0,5 mM 2-Oxoglutarat für sich keinen Effekt. Beide Substanzen zusammen bewirken jedoch, mit PII-P als Substrat, nicht aber mit Phosphocasein, eine fast komplette Hemmung der Dephosphorylierung. Diese synergistische Wirkung tritt bereits bei geringen Konzentrationen, wie 10  $\mu$ M ATP und 0,5 mM 2-Oxoglutarat, bzw. 10  $\mu$ M 2-Oxoglutarat und 0,25 mM ATP auf. Kein Hemmeffekt kann bei 0,25 mM CTP, UTP und GTP festgestellt werden und auch Glutamat und Glutamin zeigen keine Wirkung. Der Synergismus tritt nur bei Verwendung von PII-P als Substrat auf, nicht aber von Phosphocasein, so daß angenommen werden muß, daß dieser Effekt über das PII-P Protein vermittelt wird. Die Phosphatase selbst wird daher nicht direkt reguliert, sondern eine Regulation erfolgt über das PII-Protein und dessen Konformation. 2-Oxoglutarat stellt dabei denjenigen Metaboliten dar, der durch PII sensiert wird (Irmeler et al., 1997).

## 2. Versuche zur Reinigung der PII-P Phosphatase

Um gereinigte PII-P Phosphatase für weiterführende biochemische Untersuchungen zu erhalten, wurden mehrere Ansätze zur Reinigung des Enzyms unternommen. Im Folgenden soll eine Reinigungsprozedur, ausgehend von 80 g Zellfrischgewicht beschrieben werden. Die unternommenen Maßnahmen zur Optimierung der Reinigung werden anschließend kurz beschrieben. Die Aktivität der PII-P Phosphatase wurde mittels des PII-P oder des  $^{32}\text{P}$ -Casein Dephosphorylierungstests ermittelt.

Zellen von MP2, einem PII-defizienten Stamm von *Synechococcus* PCC 7942, wurden in BG11<sup>N</sup> Medium in 5 l Erlenmeyerkolben und in 4 l Glaszylindern unter CO<sub>2</sub> Begasung kultiviert. Ab dem Zeitpunkt der Ernte wurden alle Schritte bei 4°C oder eisgekühlt durchgeführt um die Enzymaktivität zu erhalten. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde ein S100 Extrakt hergestellt und die Proteine nach 50%-iger Ammoniumsulfatfällung in Puffer A (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 3 mM DTT; 1 mM Benzamidin) resuspendiert und dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DEAE Anionenaustauschersäule (125 ml) aufgetragen und mit einem Gradienten von 50 bis 550 mM KCl entwickelt. Die Aktivität eluierte bei einem Salzgehalt von 220 bis 280 mM KCl im Gradienten nach den Phycobiliproteinen, die den Hauptanteil der Proteine ausmachen und hierbei abgetrennt werden konnten. Phosphatase enthaltende Fraktionen wurden nach Ammoniumsulfatfällung über eine in Puffer A äquilibrierte Superdex 200 Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60) chromatographiert, wobei die Aktivität in einem breiten Bereich von 64 bis 108 ml eluierte. Die nachfolgende Q-Sepharose Anionenaustauschersäule (21 ml) wurde in Puffer A und einem Gradienten von 50 bis 550 mM KCl entwickelt. Die Phosphataseaktivität eluierte bei einem Salzgehalt von 230 bis 440 mM KCl im Hauptpeak der Proteine. Aktive Enzymfraktionen wurden in Puffer B (20 mM Tris/Cl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 5 mM DTT; 2 mM Benzamidin) mit 15% Ammoniumsulfat an eine hydrophobe Interaktionschromatographiesäule, Phenyl-Sepharose (20 ml), gebunden. Die Elution Phosphatase enthaltender Fraktionen erfolgte bei 0% Ammoniumsulfat. Als nächstes wurde eine Gelfiltrationschromatographiesäule, Superdex 75 (HiLoad 16/60), in Puffer B verwendet, bei der die Aktivität wieder im Hauptpeak von 40 bis 92 ml eluierte. Der Reinigungsfaktor bis hierher war circa 240-fach.

Die Phosphatase enthaltenden Fraktionen wurde in Puffer C (10 mM Acetat, pH 5,1; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 3 mM DTT; 1 mM Benzamidin) auf eine

Kationenaustauschersäule, High S (EconoPac, 5 ml) aufgetragen und mit einem 50 ml Gradienten von 50 bis 650 mM entwickelt. Die Aktivität eluierte von 250 bis 400 mM NaCl. Anschließend wurde eine Uno Q Anionenaustauschersäule (160 µl) in Puffer D (20 mM Bis Tris, pH 5,5; 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 3 mM DTT; 1 mM Benzamidin) mit einem 40 ml Gradienten von 50 bis 650 mM NaCl verwendet. Die Aktivität eluierte von 330 bis 570 mM NaCl. Ein silbergefärbtes SDS Gel zeigte 3 Fraktionen, die im Bereich von 25 bis 50 kD noch je 5 Proteinbanden enthielten. Für eine erfolgreiche N-Terminale Sequenzierung enthielt aber keine Bande eine ausreichende Proteinmenge.

### **Zusammenstellung der Optimierungsversuche zur Reinigung der PII-P Phosphatase:**

- Gelfiltrationschromatographie: Um den breiten Elutionsbereich der Phosphataseaktivität einzuengen, wurde die Salzkonzentration bis auf 500 mM erhöht und 10% Glycerin in den Laufpuffer zugefügt, beides ohne Erfolg.
- Anionenaustauscherchromatographie: Hier bestand das Problem ebenfalls darin, daß bei pH 7,4 der Elutionsbereich sehr breit war und die Elution im Hauptpeak der Proteine erfolgte. Durch Verwendung von verschiedenen „starken“ Anionentauschern und Elutionspuffern mit verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen, wurde versucht, eine spezifischere Elution der Phosphatase, bzw. eine reduzierte Bindung weiterer Proteine zu erreichen. Eine Bindung an eine HighQ Säule konnte bis pH 4,8 erzielt werden, allerdings unter hohen Protein- und Aktivitätsverlusten. Die Bindung bei pH 4,8 weist auf ein saures Protein hin, das bei diesem pH noch negativ geladen ist. Bei einer UnoQ Säule mit pH 5,5 war die Aktivität immer noch im Hauptpeak weiterer Proteine breit verteilt. Insgesamt konnte die Phosphataseaktivität durch die Anionenaustauscherchromatographie nicht ausreichend von anderen Proteinen abgetrennt werden.
- Kationenaustauscherchromatographie: An eine HighS Säule konnte die Phosphataseaktivität mit 10 mM Acetattpuffer pH 5,1 gebunden werden, was wieder mit Protein- und Aktivitätsverlusten einherging. Die Elution war auch hier in einem breiten Bereich und nicht einzuengen.
- Hydrophobe Interaktionschromatographie: Starke Bindung erfolgte an eine Phenyl Superose Säule in Anwesenheit von 15 % Ammoniumsulfat bzw. an eine Methyl Hic-

Säule bei 30 % Ammoniumsulfat. Die Elution war bei beiden Säulen wieder im Bereich der meisten Proteine. Die Phosphataseaktivität wird durch Ammoniumsulfat stark beeinträchtigt, die Proben wurden daher vor dem Aktivitätstest in Puffer A dialysiert.

- Affinitätschromatographie:

- Heparin: nur in einem salzarmen Puffer (10 mM Tris/Cl, pH 7,4; 3 mM  $MgCl_2$ ; 0,3 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM Benzamidin) konnte die Phosphataseaktivität an die Säule gebunden werden und eluierte von 25 bis 100 mM im Hauptbereich weiterer Proteine.
- Hydroxyapatit: die Bindung erfolgte hier in einem 10 mM K-Phosphatpuffer pH 6,8 mit 1 mM  $MgCl_2$ . Die Elution war in einem K-Phosphatgradienten von 80-120 mM möglich, was ebenfalls auf ein saures Protein schließen läßt. Trotz sofortiger Dialyse in Puffer A konnte aber die Aktivität, die durch Phosphationen komplett inhibiert wird, kaum wiedererlangt werden. Weitere Reinigungsschritte waren deshalb nicht möglich.
- Dye Test Kit von Sigma: eine Bindung an die verschiedenen Farbstoffe im Batch Verfahren für 2 h bei 4°C mit Puffer A1 (Puffer A, mit 30 mM NaCl) und Puffer A2 (10 mM Tris/Cl, pH 7,4; 3 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM DTT; 0,5 mM EDTA) konnte nicht festgestellt werden.
- Phosphocellulose, Affi-Gel 501, Thiopropyl-Sepharose, an CN-Br gekoppeltes L-Lysin: im Batch Verfahren fand in 2 h bei 4°C keine Bindung statt.
- an CN-Br gekoppeltes PII-Aspartat: als Substratanalogon von PII, könnte PII-Aspartat, bei dem Serin 49 durch Aspartat ersetzt wurde, die PII-P Phosphatase in einem Enzym-Substratkomplex festhalten und so deren spezifische Reinigung ermöglichen. In 2 h bei 4°C fand in Puffer A2 keine nachweisbare Enzym-Substrat Bindung statt.

Das Vorkommen der PII-P Phosphatase in der Zelle ist offensichtlich äußerst gering. In silbergefärbten SDS-Gelen konnte keine Proteinbande konstant den ermittelten PII-P Phosphataseaktivitäten in Fraktionen von chromatographischen Reinigungsschritten zugeordnet werden. Um eine erfolgreiche Reinigung mit herkömmlichen Methoden durchzuführen, wären erheblich größere Zellmengen erforderlich gewesen, wie sie aber im normalen Labormaßstab nicht zu erbringen waren. Eine Affinitätsbindung, die eine Isolierung des Enzyms erleichtert hätte, wurde nicht gefunden. Die Reinigung der PII-P Phosphatase auf diesem Weg wurde daher aufgegeben.

### 3. Identifizierung der PII-P Phosphatase in *Synechocystis* PCC 6803

*Synechocystis* PCC 6803, ein naher Verwandter von *Synechococcus* PCC 7942, verfügt über ein zu *Synechococcus* PCC 7942 hochkonserviertes PII-Protein von 81 % Identität. Bereits seit 1996 war die genomische Sequenz von *Synechocystis* PCC 6803 bekannt (Kaneko et al., 1996). Dadurch war die Möglichkeit geboten, die PII-P Phosphatase mithilfe der reversen Genetik in *Synechocystis* PCC 6803 zu identifizieren.

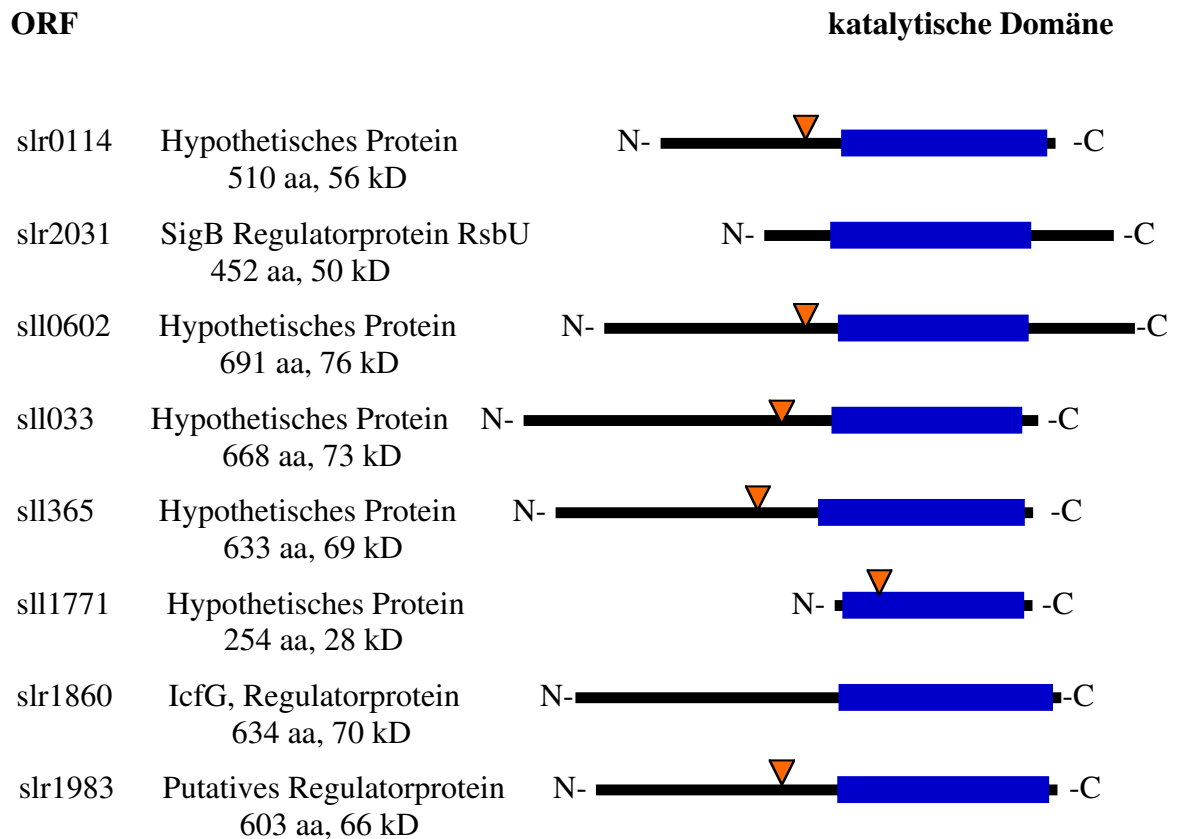
#### 3.1. Putative Phosphatasen in *Synechocystis* PCC 6803

Die Abhängigkeit von  $Mg^{2+}$ -Ionen und die fehlende Hemmung durch Phosphatase-spezifische Inhibitoren, lassen vermuten, daß es sich bei der PII-P Phosphatase um eine Phosphatase vom PP2C-Typ handeln könnte.

In *Synechocystis* PCC 6803 zeigen acht offene Leserahmen PP2C-spezifische Phosphatasemotive. Zwei dieser putativen PP2C Phosphatasen, das Regulatorprotein RsbU, codiert von *slr2031* (Kaneko et al., 1996) und das Regulatorprotein IcfG, codiert von *slr1860* (Beuf et al., 1994) sind beschrieben und werden hier nicht weiter behandelt. Die Genprodukte von *Slr0114*, *sll0602*, *sll1033*, *sll1365*, *sll1771*, *sll1983* sind als hypothetische Proteine in der Datenbank aufgeführt und wurden von Cheng-Cai Zhang (1998) und Kennelly (1998) als putative PP2C Phosphatasen beschrieben. Mittels einer BLASTP-Datenbanksuche unter Verwendung der *Myxococcus xanthus* PP2C Phosphatase Pph1 als Suchsequenz (Treuner-Lange et al., 2001) wurden in der Genombank von *Synechocystis* PCC 6803 ebenfalls die drei offenen Leserahmen *sll0602*, *sll1033* und *sll1771* gefunden. Ausser diesen sechs putativen, nicht weiter beschriebenen PP2C Phosphatasen, waren zwei weitere Phosphatasen als potentielle PII-P Phosphatasen von Interesse. *Sll1387*, das eine PP1/2A Phosphatase codiert, wurde aufgrund der spezifischen PP1/2A Motive (Cohen, 1992) in einer BLASTP-Suche gefunden. Aufgrund eines früheren Reinigungsansatzes von K. Forchhammer, wurde ein Molekulargewicht der PII-P Phosphatase von ca. 30 kD vermutet. Daher wurde *Sll1329*, eine Monophosphatase von 31,5 kD Molekulargewicht ausgewählt. *Sll0135*, eine putative Nukleosid-Phosphorylase von 34 kD, entstammt ebenfalls einem Reinigungsansatz. In Abb. 4 sind die im Genom von *Synechocystis* PCC 6803 identifizierten PP2C Phosphatasen aufgeführt. Sowohl die offenen Leserahmen der putativen PP2C Phosphatasen, als auch die Leserahmen der PP1/2A Phosphatase, der Monophosphatase und der putativen Nukleosid Phosphorylase wurden durch Insertion einer Kanamycincassette unterbrochen. Die

Insertionsstelle ist durch ein Dreieck gekennzeichnet. Die katalytische Domäne ist in allen gezeigten PP2C Phosphatasen etwa gleich gross und alle, bis auf das Genprodukt von *sll1771*, das nur aus katalytischer Domäne zu bestehen scheint, weisen zusätzliche, möglicherweise membranspannende oder regulatorische Domänen auf.

### Putative PP2C-Phosphatasen



### Weitere Phosphatasen

sll1387	PP1/2A Phosphatase, 254 aa, 28 kD
sll1329	Monophosphatase, 286 aa, 31,5 kD
sll0135	Putative Nukleosidphosphorylase, 327 aa, 36kD

**Abbildung 4:** Übersicht über putative Serin/Threonin- und weitere Phosphatasen in *Synechocystis* PCC 6803. Die katalytische Domäne der putativen PP2C Phosphatasen ist blau gekennzeichnet. Die Insertionsstelle der Kanamycincassette (*aphII*) ist durch ein Dreieck markiert.



### 3.2. Inaktivierung putativer Phosphatasen

Die Inaktivierung der sechs putativen PP2C-Phosphatasen und der drei weiteren Phosphatasen wurde wie im Material und Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Im Folgenden wird deshalb nur auf die Besonderheiten jeder Klonierung eingegangen. In Abb.5 sind in a) die Konstrukte und in b) die Autoradiogramme der Southern Blot Analysen, die die komplette Segregation der Mutation im chromosomalen Genom zeigen, aufgeführt.

3.2.1. Zur Inaktivierung von *slr0114* wurde der offene Leserahmen von 1532 bp + je 600 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 49°C annealing Temperatur und 3 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *KpnI* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *SacI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pBluescriptIIKS Vektor ligiert. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen Leserahmen über die *NheI* Schnittstelle das *aphII* Gen (KIND) inseriert. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *SmaI* hybridisiert das 548 bp *SmaI/NheI* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 2 kB und in der Mutante mit einem 1 kB DNA Fragment. Das eingesetzte *aphII* Gens ist in Leserichtung von *slr0114* inseriert.

3.2.2. Zur Inaktivierung von *sll0602* wurde der offene Leserahmen von 2073 bp + je 200 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 49°C annealing Temperatur und 2,5 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *KpnI* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *SacI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pBluescriptIIKS Vektor ligiert. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen Leserahmen über die *ApaI* Schnittstelle das *aphII* Gen (KAPA) inseriert, wodurch ein 523 bp Fragment entfernt wurde. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *BglII* hybridisiert das 875 bp *ApaI/BglII* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 1,56 kB und in der Mutante mit einem 2,34 kB DNA Fragment. Die Richtung von *aphII* in Gegenrichtung zu *sll0602* wurde durch Restriktionsanalyse ermittelt.

3.2.3. Zur Inaktivierung von *sll1033* wurde der offene Leserahmen von 2004 bp + je 200 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 51°C annealing Temperatur und 2 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *XbaI* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *SacI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pUC19 Vektor ligiert. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen Leserahmen über die

*KpnI* Schnittstelle das *aphII* Gen (KISS) inseriert. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *HindIII*, hybridisiert das 388 bp *HindIII/KpnI* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 2,6 kB und in der Mutante mit einem 0,98 kB DNA Fragment. *AphII* liegt somit in Leserichtung zu *sll1033*.

3.2.4. Zur Inaktivierung von *sll1365* wurde der offene Leserahmen von 1899 bp + je 200 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 47°C annealing Temperatur und 2 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *KpnI* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *SacI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pBluescriptIIKS Vektor ligiert. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen Leserahmen über die *XmaI* Schnittstelle das *aphII* Gen (KIXX) inseriert. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *BamHI* hybridisiert das 858 bp *BamHI/SmaI* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 0,96 kB und in der Mutante mit einem 2,27 kB DNA Fragment. Die Richtung von *aphII* in Gegenrichtung zu *sll1365* wurde durch Restriktionsanalyse ermittelt.

3.2.5. Zur Inaktivierung von *sll1771* wurde der offene Leserahmen von 762 bp + 600 bp flankierender Sequenzen 5' -seits und 700 bp 3' -seits mit geeigneten Primern bei 48°C annealing Temperatur und 2 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *HindIII* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *SacI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pUC19 Vektor ligiert. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen Leserahmen über die *KpnI* Schnittstelle das *aphII* Gen (KISS) inseriert. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *SmaI* hybridisiert das 466 bp *KpnI/SmaI* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 2,1 kB Fragment. Die Insertion von *aphII* in Leserichtung von *sll1771* ergibt ein Hybridisierungssignal bei 1,2 kB (3), die Insertion in Gegenrichtung ein Signal bei 1,57 kB (2).

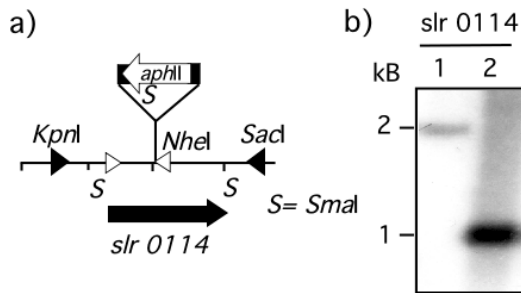
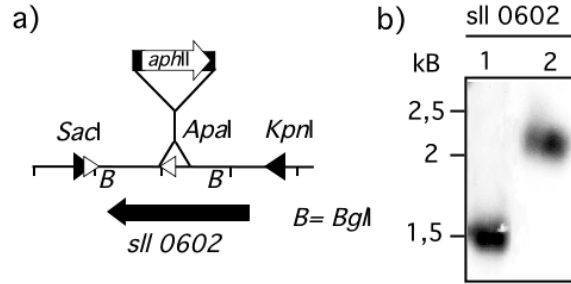
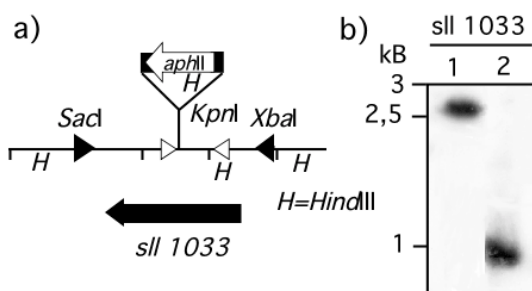
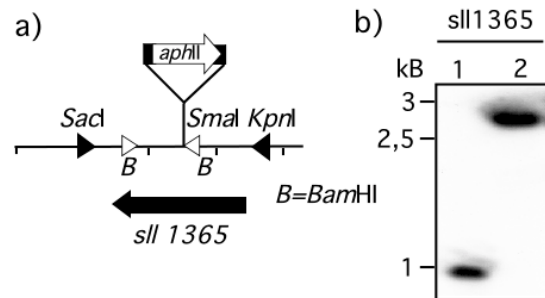
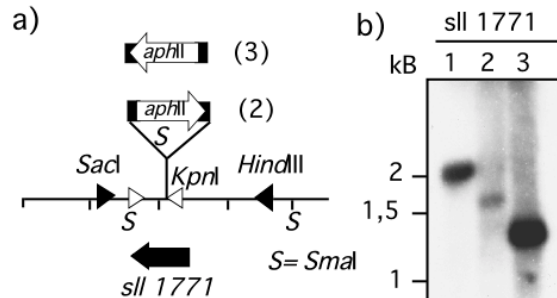
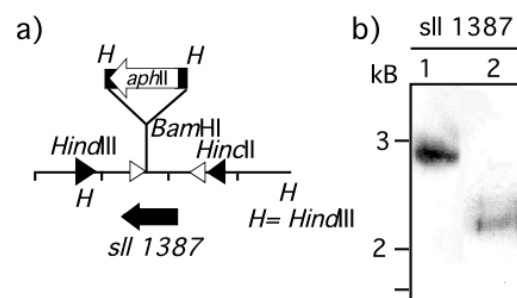
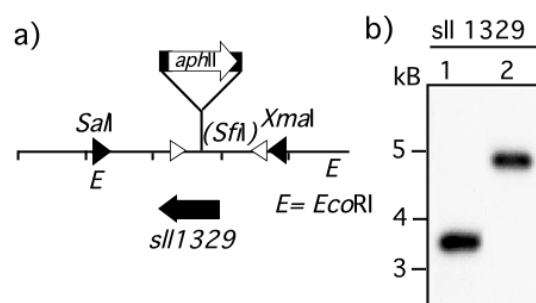
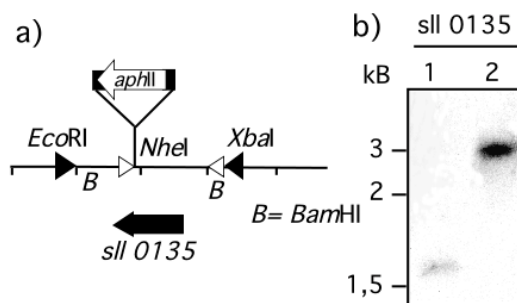
3.2.6. Zur Inaktivierung von *sll1387* wurde der offene Leserahmen von 765 bp + je 500 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 48°C annealing Temperatur und 1,5 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *HincII* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *HindIII* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pBluescriptIIKS Vektor ligiert. Durch Restriktion mit *HindIII* und *XbaI* wurde die *BamHI* Schnittstelle aus der multiplen Klonierungsstelle entfernt. Die Enden wurden mittels Klenowenzym aufgefüllt und anschließend ligiert. Die *HindIII* Schnittstelle wurde dabei zerstört. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen Leserahmen über die *BamHI*

Schnittstelle das *aphII* Gen (KIXX) inseriert. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *HindIII* hybridisiert das 737 bp *AvrII/BamHI* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 2,9 kB Fragment, in der Mutante mit einem 2,44 kB Fragment. Durch Restriktionsanalyse wurde die Richtung der *aphII* Insertion in Leserichtung von *sll1387* ermittelt.

3.2.7. Zur Inaktivierung von *sll1329* wurde der offene Leserahmen von 864 bp + je 1000 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 48°C annealing Temperatur und 2 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *XmaI* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *SalI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pUC19 Vektor ligiert. Ein korrektes Konstrukt wurde im offenen Leserahmen mit *SfiI* restringiert und die Enden mittels Klenowenzym aufgefüllt. Ein *SmaI* gespaltenes *aphII* Gen (KIXX) wurde inseriert. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *EcoRI* hybridisiert das 1531 bp *SfiI/SmaI* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 3,41 kB Fragment und die Mutante mit einem 4,61 kB Fragment. Die Richtung von *aphII* in Gegenrichtung des Leserahmens von *sll1329* wurde durch Restriktionsanalyse ermittelt.

3.2.8. Zur Inaktivierung von *sll0135* wurde der offene Leserahmen von 981 bp + je 700 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 48°C annealing Temperatur und 1,5 min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *XbaI* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *EcoRI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pUC19 Vektor ligiert. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen Leserahmen über die *NheI* Schnittstelle das *aphII* Gen (KIND) inseriert. Nach Restriktion der chromosomalen DNA mit *BamHI* hybridisiert das 1,1 kB *BamHI* und *NheI* Sondenfragment im Wildtyp mit einem 1,7 kB Fragment und die Mutante mit einem 3,02 kB Fragment. Durch Restriktionsanalyse wurde die Richtung von *aphII* in Richtung des Leserahmens von *sll0135* ermittelt.

3.2.9. Zur Inaktivierung von *slr1983* wurde der offene Leserahmen von 1809 bp + je 200 bp flankierender Sequenzen mit geeigneten Primern bei 48°C annealing Temperatur und 2min Elongationszeit amplifiziert. Durch den 5' Primer wurde eine *XmaI* Schnittstelle, durch den 3' Primer eine *KpnI* Schnittstelle eingeführt. Das PCR Produkt wurde nach Restriktion in einen pBluescriptIIKS Vektor ligiert. In ein korrektes Konstrukt wurde in den offenen

1. slr 0114 kan<sup>R</sup>2. slI 0602 kan<sup>R</sup>3. slI 1033 kan<sup>R</sup>4. slI 1365 kan<sup>R</sup>5. slI 1771 kan<sup>R</sup>6. slI 1387 kan<sup>R</sup>7. slI 1329 kan<sup>R</sup>8. slI 0135 kan<sup>R</sup>

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Klonierungen und Inaktivierungen (a) und der Southern Blot Analysen (b) der putativen Phosphatasen (1 – 8). Schwarze Pfeile markieren die betroffenen Gene; die Insertionstelle der *aphII* Kasette ist oberhalb angegeben; schwarze

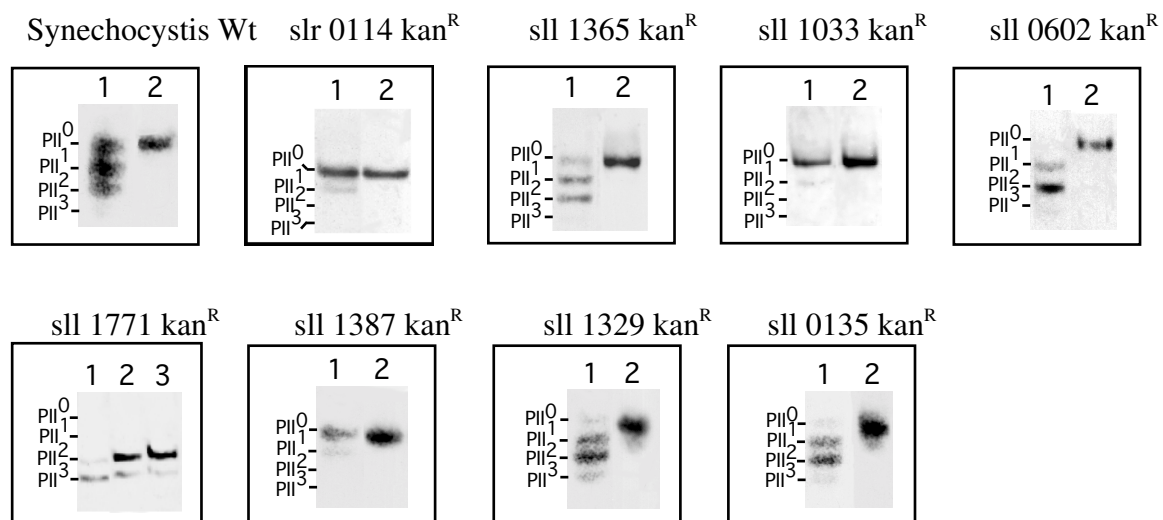
Dreiecke markieren die Primerbindestellen für die Herstellung der Mutanten; offene Dreiecke zeigen die Primerbindestellen für die Gen-spezifischen Sonden; Die unterhalb angegebenen Restriktionsschnittstellen zeigen die Spaltungen der chromosomalen DNA für die Southern Analysen ; Maßstab: — = 1kB. Spur 1, Wildtyp; Spur 2, Mutante; Spur 3, Mutante, Klon2.

Leserahmen über die Schnittstelle *EcoRI* das *aphII* Gen (KAPA) inseriert. Trotz mehrerer Versuche und erfolgreicher Transformation in *Synechocystis* PCC 6803 T konnte diese Mutation nicht vollständig segregiert werden. Möglicherweise hat die Inaktivierung dieses Gens einen letalen Phänotyp zur Folge. Auf die Untersuchung der teilweise segregierten Mutante wurde verzichtet.

### 3.3. Analyse des Phosphorylierungszustandes von PII der Mutanten nach $\text{NH}_4^+$ Schock

Das phosphoryliert vorliegende PII Protein von Zellen, die in  $\text{BG11}^{\text{N}}$  Medium kultiviert wurden, wird nach Zugabe von 5 mM  $\text{NH}_4^+$  innerhalb weniger Minuten völlig dephosphoryliert. Der erwartete Phänotyp der PII-P Phosphatase defizienten Mutante sollte eine Hemmung oder zumindest eine Verzögerung, der Dephosphorylierung von PII-P nach Zugabe von  $\text{NH}_4^+$  sein. Die vollständig segregierten Mutanten wurden deshalb mittels  $\text{NH}_4^+$  Schock auf ihre Fähigkeit der PII-P Dephosphorylierung getestet. Die Zellen wurden in 40 ml  $\text{BG11}^{\text{N}}$  Medium in Schikanekolben bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Nach Entnahme einer Probe zum Zeitpunkt 0 ( $t_0$ ) Wertes wurden 5 mM  $\text{NH}_4^+$  zugegeben und nach definierten Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung des PII Phosphorylierungszustandes entnommen. In Abb. 6 sind die Immunoblotanalysen des PII Proteins von *Synechocystis* PCC 6803 Wildtyp und den Mutanten dargestellt. Bei Wachstum in  $\text{NO}_3^-$  haltigem Medium ( $t_0$  Wert, Spur 1) zeigt PII leichte Unterschiede im Phosphorylierungsgrad, die durch die sehr empfindliche Reaktion von PII auf feinste Änderungen der Belüftung und der  $\text{CO}_2$  Versorgung erklärt werden können. Die Mutanten slr 0114  $\text{kan}^{\text{R}}$ , sl1 1033  $\text{kan}^{\text{R}}$  und sl1 1387  $\text{kan}^{\text{R}}$  sind deutlich schwächer phosphoryliert, während sl1 1771  $\text{kan}^{\text{R}}$  nur die Formen  $\text{PII}^3$  und  $\text{PII}^2$  aufweist. 5 Minuten nach Zugabe von 5 mM  $\text{NH}_4^+$  ist PII im Wildtyp und in allen Mutanten, außer sl1 1771  $\text{kan}^{\text{R}}$ , vollständig, bis  $\text{PII}^0$ , dephosphoryliert (Spur 2). PII von Sl1 1771  $\text{kan}^{\text{R}}$  weist 5 min (Spur 2) und 15 min (Spur 3) nach  $\text{NH}_4^+$  Zugabe eine schwach zunehmende Verstärkung der  $\text{PII}^2$  Bande und eine leichte Reduzierung der  $\text{PII}^3$  Bande auf. Zu keinem Zeitpunkt treten jedoch die Formen  $\text{PII}^1$  und  $\text{PII}^0$  auf. Dieser Phänotyp entspricht exakt demjenigen, der von einer PII-P Phosphatase defizienten Mutante erwartet wird.

Die Mutante *sll 1771 kan<sup>R</sup>* wurde MPphA benannt und das Genprodukt von *sll1771* entsprechend, PphA, für Protein-Phosphatase A. A kennzeichnet die erste PP2C Phosphatase in *Synechocystis* PCC 6803, deren Funktion *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen ist und deren natürliches Substrat bekannt ist.



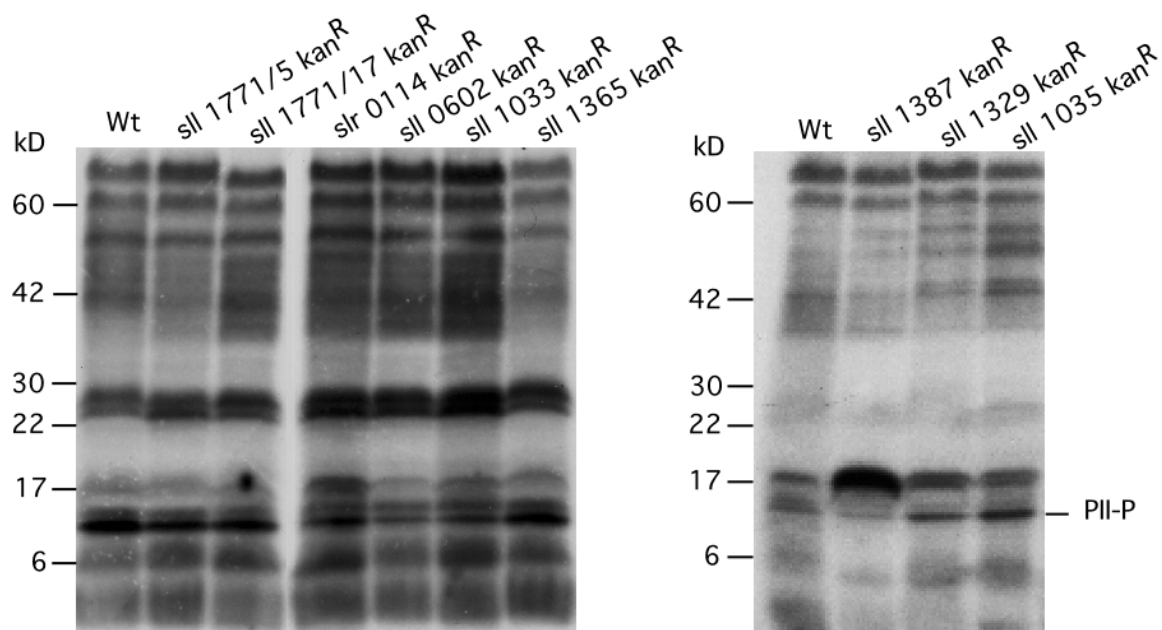
**Abbildung 6:** Immunoblotanalyse der *in vivo* Dephosphorylierung von PII-P nach  $\text{NH}_4^+$  Schock von *Synechocystis* Wt und den Phosphatasemutanten zum Zeitpunkt to (1), 5 min (2) und 15 min (3) nach Zugabe von 5 mM  $\text{NH}_4^+$ .

### 3.4. Analyse der *in vivo* $^{32}\text{P}$ Markierung

Die Inaktivierung einer Phosphatase kann zu einer gehemmten oder verzögerten Dephosphorylierung eines phosphorylierten Substrates führen. Eine *in vivo*  $^{32}\text{P}$  Markierung der Zellen kann Aufschluß darüber geben, ob eine Mutante, die eine inaktivierte Phosphatase enthält, im Vergleich zum Wildtyp, tatsächlich ein phosphoryliertes Protein anreichert. Die Identifikation dieses Proteins könnte über die Funktion des Enzyms Aufschluß geben. Von keiner der erzeugten Mutanten waren Funktion oder Substrate der putativen Phosphatase bekannt, daher wurde zunächst eine *in vivo* Markierung unter Standardbedingungen mit 30  $\mu\text{Ci}$   $\text{P}_i$  für 3 h von exponentiell in BG11<sup>N</sup> Medium gewachsenen Zellen durchgeführt. Das Autoradiogramm, welches in Abb.7 zu sehen ist, zeigt, daß im Wildtyp und den Mutanten mindestens 14 Phosphoproteine unterschieden werden können. PII-P wurde mittels Immunoblotanalyse lokalisiert und entspricht einer Phosphoproteinbande bei ca. 12 kD.

Einzig in der Mutante *sll 1387 kan<sup>R</sup>* konnte eine reproduzierbar verstärkte Phosphoproteinbande von circa 17 kD detektiert werden, wenn die Markierung der Zellen durch flüssigem Stickstoff, anstelle durch Zugabe von 5 % TCA gestoppt wurde. Die Phosphobindung ist offensichtlich nicht säurestabil. Dieses Phosphoprotein konnte auch in Stickstoffmangelzellen und in BG11<sup>A</sup> gezogenen Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Phosphobindung ist nicht stabil bei Behandlung mit 20 %-iger Trichloressigsäure bei 65°C für 3 h, so daß eine Phosphomonoesterbindung ausgeschlossen werden muß. Die Bindung ist ebenfalls nicht stabil bei pH 1, die Stabilität bei pH 12 läßt aber eine Phosphorylierung an einem Histidin- oder Lysinrest vermuten (Hardie D.G., 1992).

Eine Identifikation des Proteins mittels 2-D Gelelektrophorese gelang nicht, da im Autoradiogramm kein, im Vergleich zum Wildtyp, verstärkter Phosphospot von ca. 17 kD detektiert wurde. Dagegen trat bei einem pI von 3,2 ein neuer Spot von ca. 12 kD auf, der im Wildtyp nicht vorhanden war. Diesem Spot konnte jedoch in einem silbergefärbten Gel kein Protein zugeordnet werden.



**Abbildung 7:** *in vivo* <sup>32</sup>P Markierung.

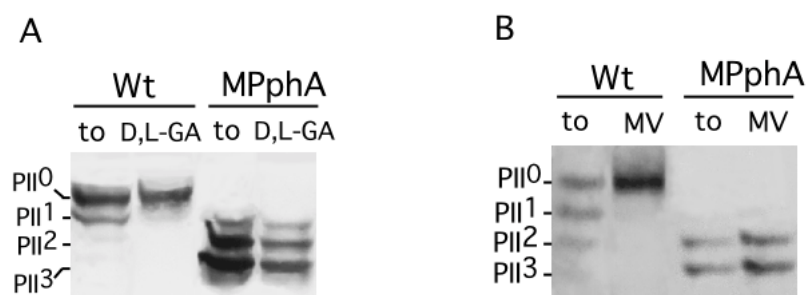
Autoradiogramm einer 10 – 18%-igen SDS-Gradienten-PAGE von SDS-Lysaten aus 2 OD<sub>750</sub> Zellen.

## 4. Physiologische Charakterisierung von MPphA

### 4.1. *in vivo* Dephosphorylierung von PII-P

MPphA sollte nicht nur nach  $\text{NH}_4^+$  Zugabe in der raschen Dephosphorylierung von PII-P inhibiert sein sondern auch unter weiteren Bedingungen, die normalerweise eine rasche PII-P Dephosphorylierung bewirken, z.B.  $\text{CO}_2$ -limitierenden und oxidativen Bedingungen. So bewirkt der Inhibitor der  $\text{CO}_2$  Fixierung, DL-Glycerinaldehyd (DL-GA), eine Abnahme des 2-Oxoglutarat Pools und damit eine Dephosphorylierung von PII-P (Irmeler et al., 1997). Der künstliche Elektronenakzeptor Methylviologen verhindert dagegen durch die Blockierung der Reduktion von NADP die  $\text{CO}_2$  Fixierung und infolgedessen die Dephosphorylierung von PII-P (Hisbergues et al., 1999). Wie aus Abb.8 A ersichtlich ist, wird durch Zugabe von 30 mM DL-GA PII-P im Wildtyp nach 5 min vollständig dephosphoryliert, während es in der Mutante MPphA unverändert stark phosphoryliert bleibt. Ebenso ist, 5 min nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Methylviologen, PII-P nur im Wildtyp völlig dephosphoryliert, in MPphA dagegen unverändert hoch phosphoryliert(B).

0,025% des Detergens CTAB, das den Efflux von 2-Oxoglutarat und anderer kleiner Moleküle aus der Zelle verursacht und damit eine sofortige PII-P Dephosphorylierung bewirkt (Irmeler et al., 1997), zeigt ebenfalls keine Wirkung bei MPphA (Daten nicht gezeigt)

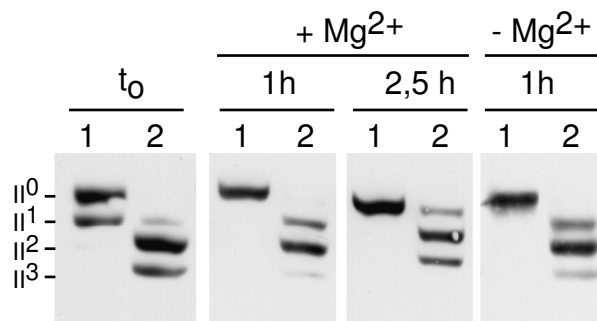


**Abbildung 8:** *In vivo* Dephosphorylierung von PII-P in *Synechocystis* PCC 6803 Wt und MPphA. Die Probennahme erfolgte aus exponentiell, in BG11<sup>N</sup> gewachsenen Zellen vor (to) und nach **A:** 5 min Inkubation mit 30 mM DL-GA, bzw. **B:** nach 5 min Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Methylviologen (MV).

### 4.2. Gibt es weitere Phosphatasen, die PII-P dephosphorylieren?



Die Fähigkeit zur Dephosphorylierung von PII-P ist bei MPphA stark reduziert, dennoch zeigt die Zugabe von 5 mM  $\text{NH}_4^+$  nach 15 min eine leichte Verschiebung der Banden zu einer Dephosphorylierung hin (Abb.6). Rohextrakt von MPphA wurde deshalb in Anwesenheit von 20 mM  $\text{MgCl}_2$  1 h und 2,5 h bei 37°C inkubiert um mögliche weitere PP2C-Phosphatasen zu aktivieren. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne  $\text{Mg}^{2+}$  für 1 h inkubiert. Wie aus Abb. 9 hervorgeht, findet in der Tat eine Verschiebung der Banden von  $\text{PII}^{3,2,1}$  bei  $t_0$ , zu  $\text{PII}^{2,1,0}$  nach 2,5 h in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$  statt. Die bereits nach 1 h Inkubation erkennbare leichte Verschiebung der Banden in An- und in Abwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$  läßt jedoch auf eine unspezifische, von  $\text{Mg}^{2+}$ -unabhängige Dephosphorylierung schließen.



**Abbildung 9:** *In vitro* Inkubation von Rohextrakten von *Synechocystis* Wt (1) und MPphA (2) bei 37°C in Anwesenheit von 20 mM  $\text{MgCl}_2$  für 1h und 2,5 h und 1h ohne  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $t_0$  zeigt PII von in BG11<sup>N</sup> gezogenen Zellen.

### 4.3. Untersuchungen zum Wachstum / funktionelle Analyse von *pphA*

#### 4.3.1. Wachstum bei verschiedenen Stickstoffbedingungen

Zellen von MP2, einer PII-defizienten Mutante, zeigen bei Wachstum auf BG11<sup>N</sup> Medium eine etwa 10 %-ige Verlangsamung des Wachstums (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995). In Anwesenheit von  $\text{NH}_4^+$  wächst MP2 nur bei einem pH unter 8 und ein Shift von  $\text{NO}_3^-$  auf  $\text{NH}_4^+$  verursacht eine Einstellung des Wachstums für ca. 3 Tage. Wie verhält sich nun eine PII deregulierte Mutante, wie MPphA, unter diesen Bedingungen?

Um das herauszufinden, wurden Zellen aus einer stationären BG11<sup>N</sup> Kultur in BG11<sup>N</sup> und in BG11<sup>A</sup> Medium in Schikanekolben unter Standardbedingungen angezogen und das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 750 nm verfolgt. Nach zwei Generationszeiten wurden Proben für die PII Analyse entnommen. Zum gleichen Zeitpunkt wurden Absorptionsspektren

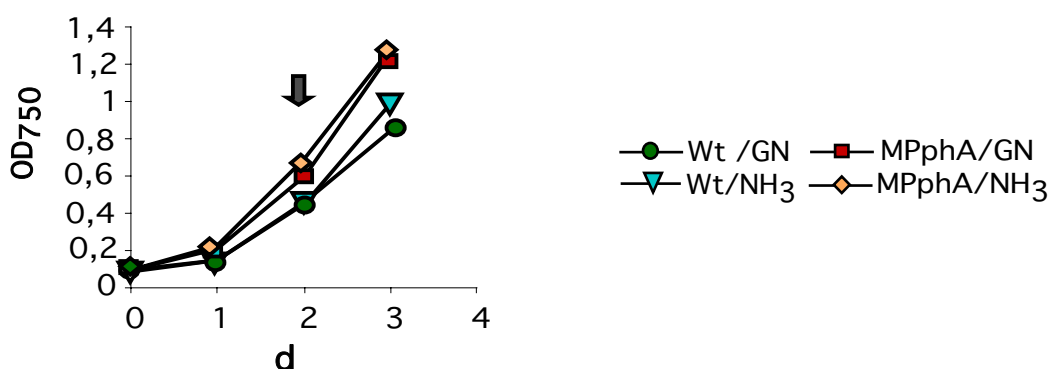
erstellt um den Pigmentgehalt abzuschätzen. Der Verlauf der Wachstumskurven in Abb.10 A zeigt für MPphA ein, im Vergleich zum Wildtyp, um ca.15 % beschleunigtes Wachstum in BG11<sup>N</sup> ebenso wie in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Medium.

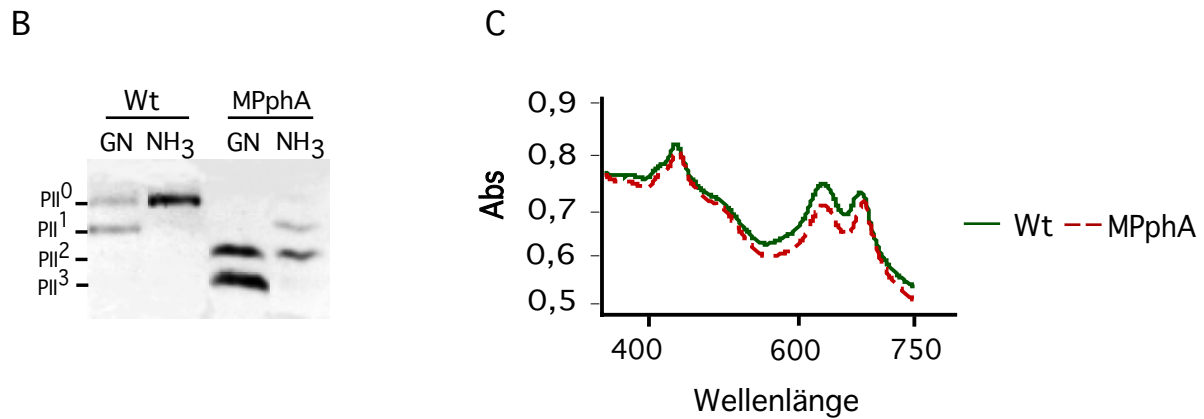
PII ist in BG11<sup>N</sup> Medium deutlich stärker phosphoryliert (PII<sup>3,2</sup>) als der Wildtyp (Abb.10 B). Das Wachstum in BG11<sup>A</sup> Medium zeigt ein ebenfalls phosphoryliertes PII (PII<sup>2,1,0</sup>). Diese Deregulation von PII scheint das Wachstum der Mutante, unter den angelegten Bedingungen in keiner Weise zu beeinträchtigen.

PII aus einer Zellanzucht von Zellen, die über einen längeren Zeitraum in BG11<sup>A</sup> Medium gewachsenen waren und aus einer BG11<sup>A</sup> Kultur angeimpft worden waren, enthielt dagegen hauptsächlich unmodifiziertes PII<sup>0</sup> mit wenig PII<sup>1</sup>.

Nicole Kloft stellte fest, daß bei Hemmung der Proteinsynthese mit 2,9 µg/ml Chloramphenicol nach Zugabe von 5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> eine kontinuierliche Dephosphorylierung bis PII<sup>0</sup> erfolgte. Damit wird bestätigt, daß die langsame Dephosphorylierung von PII-P vermutlich durch die Aktivität unspezifischer Phosphatasen verursacht wird, wie es auch bei der *in vitro* Inkubation mit 20 mM MgCl<sub>2</sub> gezeigt wurde (4.2.). Ein proteolytischer Abbau von PII-P und Neusynthese von PII<sup>0</sup>, bei einer in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Medium gehemmten Kinase, kann somit ausgeschlossen werden.

A





**Abbildung 10:** Wachstum, PII Analyse und Absorptionsspektrum von *Synechocystis* Wt und MPphA in BG11<sup>N</sup> (GN) und BG11<sup>A</sup> (NH<sub>3</sub>) Medium. **A:** Wachstumsverlauf bei OD<sub>750</sub>; der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Probennahme. **B:** PII Analyse. **C:** Absorptionsspektrum von 350 bis 750 nm von in BG11<sup>N</sup> Medium kultivierten Zellen.

Ob NH<sub>4</sub><sup>+</sup> direkt zu in BG11<sup>N</sup> gewachsenen Zellen gegeben wurde (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Shock) oder die Zellen in BG11<sup>A</sup> Medium überführt wurden (shift) machte keinen Unterschied in der Geschwindigkeit der Dephosphorylierung oder des Wachstums. MPphA hat offenbar keine Probleme mit der abrupten Umstellung von NO<sub>3</sub><sup>-</sup> auf NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Medium.

Ein Unterschied zweier Klone (5 und 17) die die Kanamycincassette in entgegengesetzter Richtung enthalten, wodurch möglicherweise polare Effekte auf benachbarte Genloci ausgeübt werden, konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Wie aus dem Absorptionsspektrum in Abb.10 C hervorgeht, weist MPphA, bei Wachstum in BG11<sup>N</sup>, einen deutlich reduzierten Gehalt an Phycobiliproteinen auf, der Gehalt an Chlorophyll a ist dagegen unverändert. Ein vergleichbares Pigmentmuster findet sich normalerweise im Wildtyp bei Wachstum in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Medium.

In Tabelle 5 sind weitere Parameter des Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus zusammengefaßt: der Glycogengehalt ist sowohl bei Wachstum in BG11<sup>N</sup> als auch in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Medium bei Wildtyp und MPphA ähnlich. Kein Unterschied besteht auch in der Aktivität der Glutaminsynthetase, sowohl in der Gesamtaktivität, die als Transferaseaktivität gemessen wird, als auch in der tatsächlichen, biosynthetischen Aktivität.

In der exponentiellen Wachstumsphase in BG11<sup>N</sup> Medium scheidet die Mutante ein 14-faches an Nitrit, im Vergleich zum Wildtyp, aus. Die Nitratreduktase Aktivität ist um ein Drittel erhöht und die Nitritreduktaseaktivität entspricht der des Wildtyps. Das hohe Ausscheiden

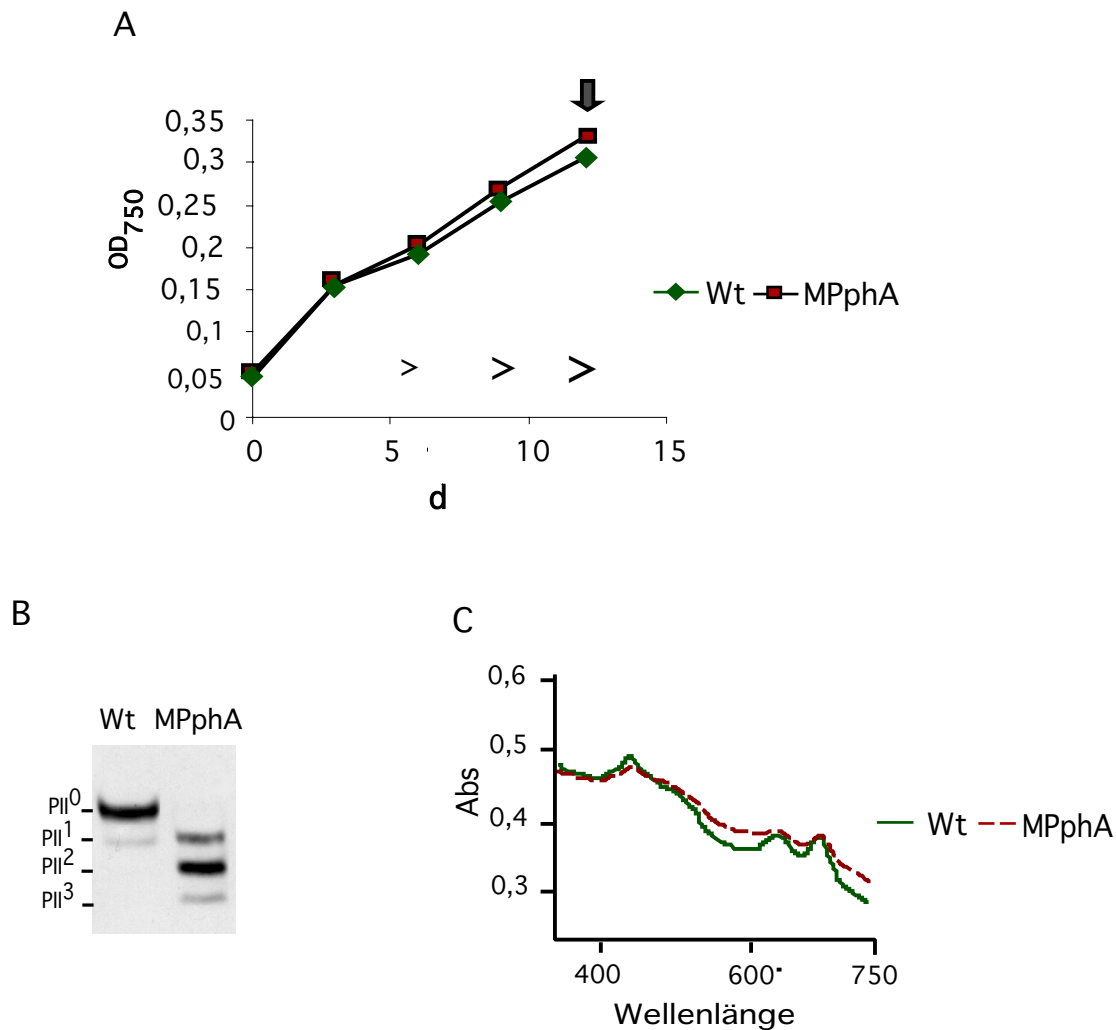
von Nitrit wird auch bei MP2 beobachtet und weist auf eine Deregulation der Nitrat Assimilation hin (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995).

#### 4.3.2. Wachstum bei niedriger CO<sub>2</sub> Konzentration

Die PII defizienten Mutanten MP2 und *Synechocystis* ΔPII zeigen keine Anpassungs- oder Wachstumsprobleme bei niedriger CO<sub>2</sub> Versorgung (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995; Hisbergues et al., 1999). Wie Hisbergues et al. (1999) zeigten, ist in *Synechocystis* ΔPII der hochaffine C-Transporter HAT, unabhängig von der Stickstoff- und der tatsächlichen CO<sub>2</sub> Versorgung der Zellen aktiv. Ein nicht regulierbares bzw. ein fehlreguliertes PII, wie in MPphA, könnte möglicherweise Einfluß auf das Wachstum der Zellen bei niedriger Versorgung mit CO<sub>2</sub> haben. Daher wurden Zellen aus einer stationären BG11<sup>N</sup> Kultur in BG11<sup>N</sup> ohne NaHCO<sub>3</sub> in 100 ml Schraubflaschen zu einer OD<sub>750</sub> von 0,05 angeimpft und stehend bei 20 µE Licht inkubiert. Einmal pro Tag wurden die Zellen vorsichtig aufgeschüttelt, vor allem um den gebildeten Sauerstoff zu entlassen. Die Grafik in Abb. 11 A zeigt ein langsames und gleichmäßiges Wachstum von Wildtyp und Mutante. Nach fünf Tagen beginnt MPphA aber gelblich zu werden, was sich fortsetzt bis zu einer schmutzig-grün-gelblichen Farbe (Abb. 12). Ein völliges Ausbleichen, wie es in einer Stickstoffchlorose stattfindet, kann hier aber nicht beobachtet werden. Abb. 11 C zeigt die drastische Abnahme von Chlorophyll a und den Phycobiliproteinen nach zwölf Tagen Wachstum bei niedriger CO<sub>2</sub> Konzentration und 7 Tage nach Beginn des Ausbleichens von MPphA. Der Pigmentgehalt des Wildtyps ist ebenfalls stark reduziert, die Zellen bleichen aber nicht aus sondern bleiben grün.

Die Zugabe von 5 mM NaHCO<sub>3</sub> zu 39 Tage lang ausgebleichten MPphA Zellen bewirkt eine Pigmentneubildung und damit eine Wiederergrünung und Regeneration nach wenigen Tagen. Na-Acetat als C-Quelle zeigt keine Wirkung.

Unter CO<sub>2</sub>-Mangelbedingungen liegt PII im Wildtyp dephosphoryliert vor (Abb.11 B). PII von MPphA ist dagegen stark phosphoryliert mit den Formen PII<sup>1,2,3</sup>.



**Abbildung 11:** Wachstum, PII Analyse und Absorptionsspektrum von *Synechocystis* Wt und MPphA bei Wachstum in BG11<sup>N</sup> bei niedriger CO<sub>2</sub>Konzentration. **A:** Wachstumsverlauf bei OD<sub>750</sub>; Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Probennahme; > zeigt das zunehmende Ausbleichen an. **B:** PII Analyse. **C:** Absorptionsspektrum von 350 bis 750 nm.

Unter sonst identischen Bedingungen, führt eine Anzucht der Zellen in BG11<sup>A</sup> Medium in Abwesenheit von NaHCO<sub>3</sub>, zu einem extrem verlangsamten Wachstum unter starker Schleimbildung von *Synechocystis* Wt und MPphA. Es kommt aber zu keinem Ausbleichen sondern die Zellen bleiben grün. PII liegt in diesen Anzuchten bei Wildtyp und MPphA völlig dephosphoryliert vor (nicht gezeigt)

Interessanterweise verhalten sich *Synechococcus* PCC 7942 Wt und die Mutanten MP2-D und MP2-E ähnlich, die das phosphorylierbare Serin 49 von PII durch Aspartat bzw. Glutamat ersetzt haben, was eine „Dauerphosphorylierung“ von PII nachahmt. Bei Anzucht in BG11<sup>N</sup> unter niedrigen CO<sub>2</sub> Bedingungen, verlieren beide Mutanten deutlich an Chlorophyll a und an

Phycobiliproteinen und werden hellgrün. Der Wildtyp bleibt dunkelgrün. Dieses Phänomen tritt bei diesen Mutanten bei Anzucht in BG11<sup>A</sup> Medium in Abwesenheit von NaHCO<sub>3</sub> sogar noch stärker auf. Die Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> oder Na-Acetat zu den ausgebleichenen Zellen führt zu keiner Regeneration.



**Abbildung 12:** Ausbleichen von MPphA (2), MP2-D (4) und MP2-E (5) nach Wachstum in BG11<sup>N</sup> Medium bei niedriger CO<sub>2</sub> Konzentration im Vergleich zu *Synechocystis* Wt(1) und *Synechococcus* Wt(3).

**Tabelle 5:** Zusammenfassung physiologischer Parameter von *Synechocystis* PCC 6803 und MPphA nach Wachstum in BG11<sup>N</sup> (GN) und BG11<sup>A</sup> (NH<sub>3</sub>).(-), nicht bestimmt.

		Exponentielles Wachstum		niedrige CO <sub>2</sub> Konzentration	
		GN	NH <sub>3</sub>	GN	NH <sub>3</sub>
Glycogen µg/ml/OD <sub>750</sub>	S.cystis	21,7	24,4	9,6	10
	MPphA	22,9	17,8	7,8	9,8
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> µg/ml/OD <sub>750</sub>	S.cystis	1	0,28	2,2	1,9
	MPphA	14	0,37	4,1	0,7
GS-transferase µmol/min/ OD <sub>750</sub>	S.cystis	0,21	0,07	0,013	0,015
	MPphA	0,22	0,07	0,015	0,033
Biosynth.GS µmol/min/ OD <sub>750</sub>	S.cystis	0,012	0,002	0,002	0,004
	MPphA	0,014	0,003	0,002	0,006
Nitrat- Reduktase nmol/min/ OD <sub>750</sub>	S.cystis	0,4	-	-	-
	MPphA	0,6	-	-	-
Nitrit- Reduktase nmol/min/ OD <sub>750</sub>	S.cystis	0,9	-	-	-
	MPphA	1	-	-	-

Wie in Tabelle 5 gezeigt, sind der Glycogengehalt und die Glutaminsynthetaseaktivität unter den niedrigen  $\text{CO}_2$ -Bedingungen von Wildtyp und Mutante ähnlich. Die Ausscheidung von Nitrit von MPphA ist hier reduziert und beträgt noch ca. das Doppelte der des Wildtyps.

#### 4.3.3. Stickstoffentzug

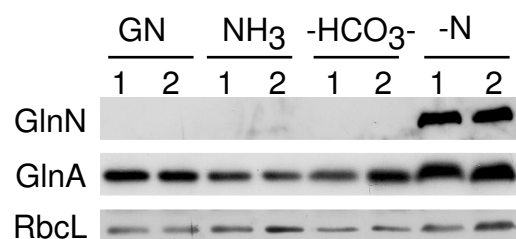
Der Entzug von gebundenem Stickstoff führt bei MPphA Zellen, ebenso wie beim Wildtyp nach 3 Tagen zu einer Chlorose. PII liegt dabei hochphosphoryliert als  $\text{PII}^{2,3}$  vor. Die Zugabe von 18 mM  $\text{NO}_3^-$  nach 18 Tagen Chlorose bewirkt eine vollständige Regeneration der Zellen von Wildtyp und Mutante.

#### 4.3.4. Nitrat-abhängige $\text{O}_2$ Freisetzung

In Cyanobakterien ist die Nitratreduktion direkt abhängig vom photosynthetischen Elektronenfluß und kann anhand der Sauerstoffentwicklung quantifiziert werden. Um spezifisch die Nitrat-abhängige  $\text{O}_2$  Entwicklung zu erfassen, muß die  $\text{CO}_2$ -abhängige  $\text{O}_2$  Entwicklung gehemmt werden. Das geschieht durch die Zugabe von 30 mM DL-GA, wodurch die Nitrataufnahme, PII-vermittelt, unterbunden wird. Eine vorangehende Behandlung der Zellen mit MSX blockiert die Aktivität der Glutaminsynthetase, wodurch PII phosphoryliert wird und der Nitrattransporter dadurch aktiviert wird. Die Hemmung der  $\text{CO}_2$  Fixierung durch DL-GA bewirkt eine Hemmung der Nitrataufnahme, wie in *Synechococcus* PCC 7942 gezeigt wurde (Romero et al., 1985). Im Gegensatz dazu findet nach der Zugabe von 10 mM Nitrat bei *Synechocystis* Wt und bei MPphA, trotz der Hemmung der  $\text{CO}_2$  Fixierung durch DL-GA, eine Nitrat-abhängige Sauerstoffentwicklung von 71 nmol  $\text{O}_2$ /min/OD (Wt) und 53 nmol  $\text{O}_2$ /min/OD (MPphA) statt. Durch eine vorausgehende Hemmung der GS-Aktivität mit MSX werden ähnliche Mengen  $\text{O}_2$  freigesetzt, nämlich im Wildtyp 62 nmol  $\text{O}_2$ /min/OD und in MPphA 53 nmol  $\text{O}_2$ /min/OD. Wie J. Goltsche zeigte (persönliche Mitteilung von K. Forchhammer), bleibt phosphoryliertes PII-Protein von Zellen, die 2 h in stickstofffreiem BG11 Medium inkubiert waren, auch nach der Zugabe von DL-GA bei *Synechocystis* Wt und bei MPphA stark phosphoryliert. Der starke Phosphorylierungszustand von PII in *Synechocystis* Wt und bei MPphA in Anwesenheit von DL-GA ist hier vermutlich für die Nitrataufnahme und den Elektronenfluß zur  $\text{O}_2$ -freisetzenden Nitratreduktion verantwortlich.

#### 4.4. Expression von *glnA*, *glnN* und *rbcL*

Mittels Immunoblotanalysen einer SDS-PAGE wurden die Proteinmengen der Glutaminsynthetase I (*glnA* Genprodukt), der Glutaminsynthetase III (*glnN* Genprodukt) und der Rubisco, über deren große Untereinheit RbcL, semiquantitativ erfaßt. Abbildung 13 zeigt die Expression von GlnA, GlnN und RbcL unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Zellen von *Synechocystis* Wt und MPphA aus stickstofffreiem Medium waren bereits chlorotisch, ebenso wie die in BG11<sup>N</sup> Medium ohne HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> gezogenen Zellen von MPphA. Wie von Florencio et al. (1997) beschrieben, ist die Expression von *glnA* und *glnN* von der Stickstoffquelle abhängig, wobei *glnN* nur im Stickstoffmangel und *glnA* dort verstärkt exprimiert wird. So konnte GlnN (GS III) in MPphA, in gleicher Menge wie im Wildtyp, nur bei Zellen im Stickstoffmangel nachgewiesen werden. Äquivalente Mengen von GlnA (GSI) wurden in MPphA und im Wildtyp bei Wachstum in BG11<sup>N</sup>, und etwas weniger bei Wachstum in BG11<sup>A</sup> Medium detektiert. In Stickstoffmangelzellen wird GlnA deutlich stärker exprimiert. Einzig in den bereits chlorotischen Zellen ist die Expression von *glnA* etwas stärker in der Mutante als im Wildtyp, was aber nicht mit einer erhöhten GS Gesamtaktivität korreliert (Tab.5). Die Expression von *rbcL* ist unter allen getesteten Bedingungen bei Wildtyp und Mutante ähnlich.



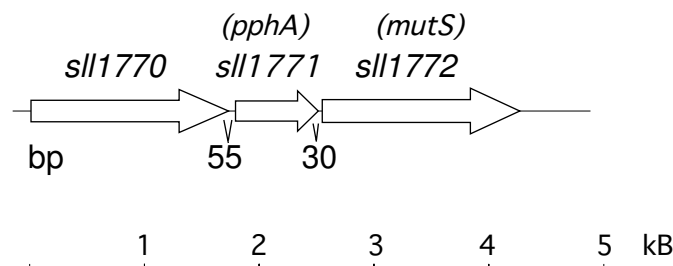
**Abbildung 13:** Immunoblotanalyse der GlnA, GlnN und RbcL Proteine in *Synechocystis* PCC 6803 (1) und MPphA (2) aus Zellen, die in BG11<sup>N</sup> (GN), in BG11<sup>A</sup> (NH<sub>3</sub>), in BG11<sup>N</sup> ohne NaHCO<sub>3</sub> (-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und in stickstofffreiem BG11 Medium (-N) angezogen wurden. Je 5 µg Gesamtprotein wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

#### 4.5. Bestimmung der Transkriptgröße von *pphA*

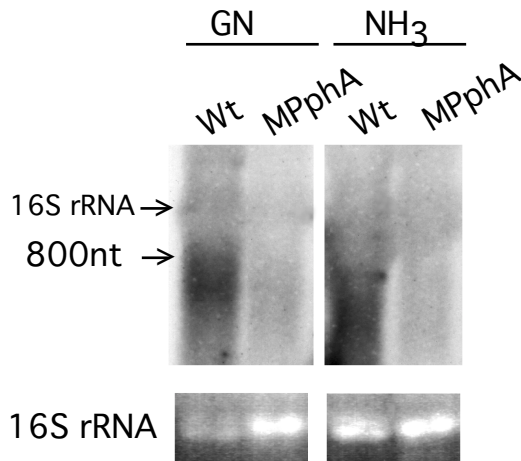


Wie die Organisation des bakteriellen Chromosoms von *Synechocystis* PCC 6803 zeigt (Kaneko et al., 1997), liegt *pphA* (*sll1771*) dicht benachbart unterhalb von *sll1770* und oberhalb von *sll1772* (Abb.14 A). Um festzustellen, ob *pphA* als monocistronische RNA transkribiert wird oder in einer Transkriptionseinheit mit benachbarten Genen, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus *Synechocystis* mit einem 762 Nt langen  $^{32}\text{P}$  markiertem DNA Fragment, das für den gesamten offenen Leserahmen von *pphA* codiert, hybridisiert. Abb. 14 B zeigt, daß ein einziges Transkript von circa 800 Nt detektiert wurde, das der Länge des offenen Leserahmens von 765 bp entspricht und in BG11<sup>N</sup> und in BG11<sup>A</sup> kultivierten Zellen vorhanden ist. *PphA* wird demzufolge monocistronisch und konstitutiv in  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NH}_4^+$  Medium transkribiert. Die Hybridisierung mit MPphA RNA wurde als Kontrolle mitgeführt und zeigt erwartungsgemäß kein Signal.

A



B



**Abbildung 14:** **A:** chromosomale Organisation von *sll1771*(*pphA*) nach Kaneko et al., 1996); Die Abstände zwischen den Genen sind angegeben. **B:** Northern Blot Analyse zur Bestimmung der Transkriptgröße von *pphA* mRNA. 30 µg Gesamt RNA von *Synechocystis* Wt und MPphA Zellen aus BG11<sup>N</sup> und BG11<sup>A</sup> Medium wurden mit 10 ng markiertem *pphA* Fragment hybridisiert.

## 5. Biochemische Charakterisierung von PphA

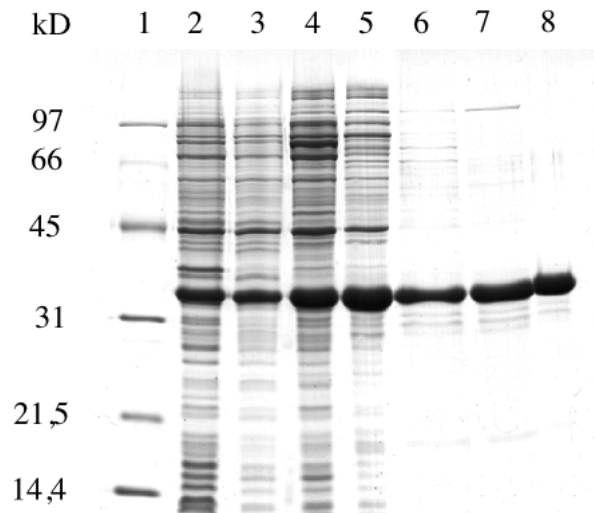
### 5.1. Überproduktion und Reinigung von PphA

Mit Hilfe des pT 7-7 Vektorsystems konnte *pphA* in *E. coli* BL21(DE3) Zellen zu ca. 50 % des Gesamtzellproteingehalts überproduziert werden. Ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel zeigte eine stark überexprimierte Bande bei ungefähr 34 kD, sowohl in den Ganzzelllysaten, als auch in den Rohextrakten. Das Enzym lag demnach in ausreichender Menge gelöst vor.

Um zu kontrollieren, ob das überproduzierte Enzym funktionsfähig und aktiv ist, wurden 5 µg Rohextrakt auf die Dephosphorylierung von PII-P getestet. Der Rohextrakt der PphA überproduzierenden Zellen zeigte, ebenso wie die Positiv Kontrolle, Alkalische Phosphatase, eine 100%-ige Dephosphorylierung von PII-P und wies damit auf ein äußerst aktives Enzym hin. Erste Versuche mit ATP und 2-Oxoglutarat zeigten bereits hier, im Rohextrakt des *E.coli* Milieus, den synergistischen Hemmeffekt, der aus teilgereinigter *Synechococcus* PCC 7942 PII-P Phosphatase bekannt war. In Kontrollansätzen mit pT7-7 transformierten *E.coli* Zellen finden sich keine Enzyme, welche in der Lage sind, PII-P zu dephosphorylieren, so daß eine derartige Enzymreaktion ausschließlich auf das überproduzierte PphA zurückzuführen ist.

Gemäß dem in Abb. 15 gezeigten Reinigungsgang ergaben 3,3 g Zellen 420 µg Enzym, das in 12,5%-iger, Coomassie gefärbter SDS-PAGE scheinbar homogen war. Die Reinigung wurde nicht weiter hinsichtlich höherer Enzymausbeute optimiert, da die erzielte Menge für die biochemischen Analysen ausreichend war. Das gereinigte Enzym wurde in Lagerpuffer mit 5 mM  $Mg^{2+}$  und 50% Glycerin bei  $-20^{\circ}C$  aufbewahrt.

Das errechnete Molekulargewicht von PphA beträgt 28,4 kD. In der SDS-PAGE entspricht die PphA Bande einem Molekulargewicht von ca. 33 kD, was durch ein aberrantes Laufverhalten erklärt werden könnte, wie es auch bei PrpC (*yloO* Genprodukt) aus *Bacillus subtilis* beobachtet wurde (Obuchowski et al., 2000). Von einer Superdex 200 Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60) eluierte das native Enzym bei einem Volumen, das dem eines 34 kD Proteins entspricht, so daß angenommen werden kann, daß PphA im nativen Zustand als Monomer vorliegt. Die Differenz zwischen dem apparenten und dem kalkulierten Molekulargewicht ist vermutlich durch die Proteinstruktur begründet.

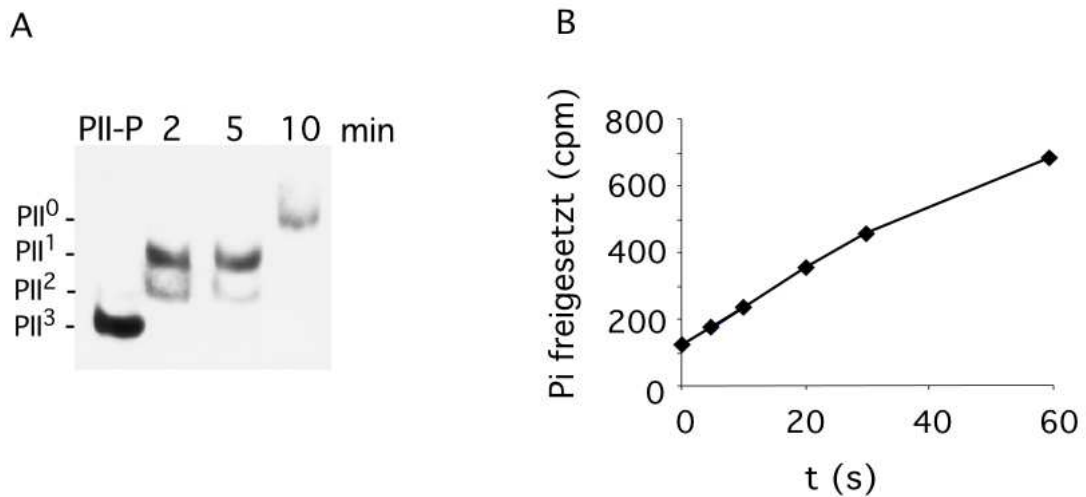


**Abbildung 15:** Reinigung der überproduzierten PphA. Der Verlauf der Reinigung ist an einem Coomassie gefärbten 12,5%-igen SDS-Gel gezeigt. Es wurden Aliquots der Eluate aufgetragen. Reinigungsschritte bzw. Spuren: 1: Proteingrößenstandard, 2: S10, 3: S100, 4:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Präzipitat, 5: DEAE Anionenaustauscher- chromatographie, 6: UnoQ Anionenaustauscherchromatographie, 7: Methyl Hic hydrophobe Interaktionschromatographie, 8: Superdex 200 Gelfiltrationschromatographie.

## 5.2. Enzymatische Aktivität von PphA

### 5.2.1. Dephosphorylierung von PII-P und Phosphocasein

Wie bereits der teilgereinigte PII-P Phosphataseextrakt, wies auch die gereinigte PII-P Phosphatase PphA eine hohe Aktivität gegenüber dem Originalsubstrat PII-P, sowie gegen Phosphocasein, Phosphohistone, *p*-NPP und den Phosphatase-Substraten T (Phosphothreonin) und S (Phosphoserin) auf. Auch das Phosphatase-Substrat Phosphotyrosin wird dephosphoryliert. In Abb. 16 A ist die Dephosphorylierung von PII-P im Zeitverlauf gezeigt. Nach 2 min sind 55 % des Substrates umgesetzt und nach 10 min ist PII-P völlig dephosphoryliert. Abb. 16 B zeigt die Kinetik der Dephosphorylierung von Phosphocasein. Bei den eingesetzten Enzym- und Substratmengen ist ein linearer Verlauf der Reaktion bis 30 s erkennbar. Dieser Test ist sehr sensitiv und gut zu quantifizieren und damit für kinetische Analysen geeigneter als der PII-P Dephosphorylierungstest.



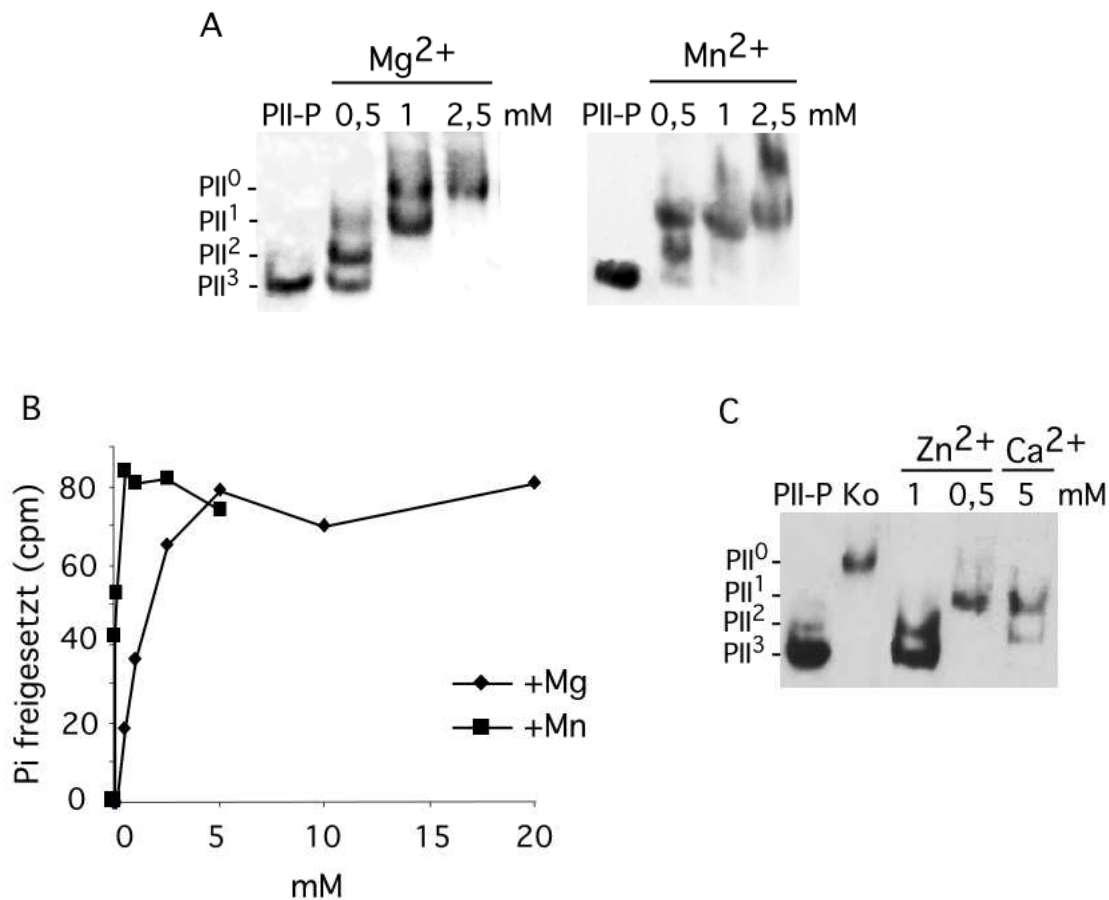
**Abbildung 16:** Dephosphorylierung im Zeitverlauf unter Standardreaktionsbedingungen von **A:** 40 nM PII-P durch 0,4 pmol gereinigte PphA. **B:** 80 nM Phosphocasein durch 50 fmol PphA.

Die Enzymaktivität der gereinigten PphA unterliegt sowohl mit PII-P als auch mit Phosphocasein als Substrat demselben Hemmmuster von spezifischen und unspezifischen Inhibitoren wie der teilgereinigte Phosphataseextrakt aus *Synechococcus* PCC 7942 und wird deshalb hier nicht genauer dargestellt.

### 5.2.2. Einfluß von 2-wertigen Kationen

Wie bei allen PP2C Phosphatasen der PPM Familie, ist auch die Aktivität von PphA von den divalenten Kationen  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  zwingend abhängig. In Abb. 17 A ist die Zunahme der Aktivität gegenüber PII-P mit steigender  $Mg^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ -Konzentration korreliert.  $Mn^{2+}$  bewirkt bereits bei 0,5 mM eine im Vergleich zu  $Mg^{2+}$  höhere Enzymaktivität, führt jedoch bereits bei geringen Konzentrationen zu unscharfen Banden und Schmier im Gelsystem und wird deshalb in dem PII-P Dephosphorylierungssystem nicht verwendet. In allen anderen beschriebenen Dephosphorylierungstests sind sowohl  $Mg^{2+}$  als auch  $Mn^{2+}$  enthalten, um maximale Aktivität zu erreichen. Die PphA Aktivität gegenüber *p*-NPP benötigt essentiell  $Mn^{2+}$ -Ionen.  $Mg^{2+}$ -Ionen alleine führen zu keiner Dephosphorylierung des Substrates, ein Phänomen, das auch bei PrpC beschrieben ist (Obuchowski, 2000). Abb.17 B zeigt die Abhängigkeit der PphA Aktivität von  $Mg^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ -Ionen mit Phosphocasein als Substrat. Die Dephosphorylierung von Phosphocasein erlaubt eine exakte quantitative Bestimmung des

Substratumsatzes. Wie aus der Grafik hervorgeht, ist bei einer  $\text{Mn}^{2+}$ -Konzentration von 0,5 mM bereits die maximale Aktivierung erreicht, bei  $\text{Mg}^{2+}$  bei 5 mM.



**Abbildung 17:** Einfluß von divalenten Kationen auf die Aktivität von PphA. **A, B:** Abhängigkeit der Dephosphorylierung von  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  Ionen. **A:** mit dem Substrat PII-P und 0,4 pmol PphA. **B:** mit Phosphocasein und 0,6 pmol PphA. **C:** Hemmung von 0,4 pmol PphA durch  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen; Ko, Kontrolle mit 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ .

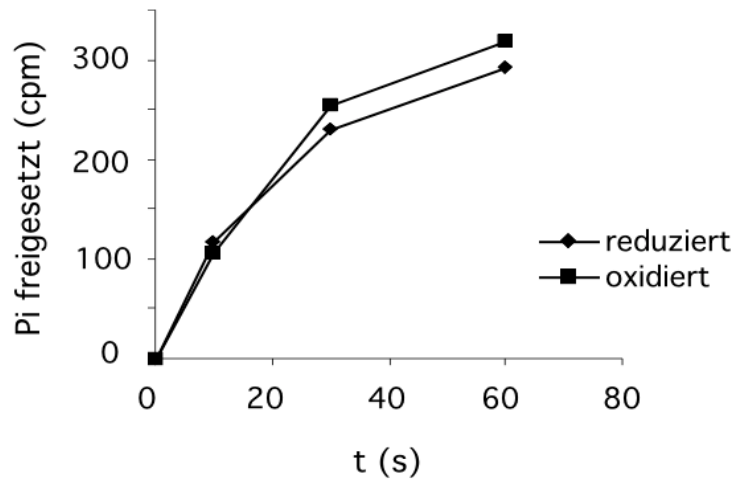
Die Zugabe von 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  bewirkt eine fast vollständige Hemmung der Dephosphorylierung von 83%. 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  hemmen die Aktivität partiell zu 50 % (Abb. 17 C). Wie Fjeld und Denu bei der kinetischen Analyse der humanen PP2C $\alpha$  herausfanden (Fjeld C. and Denu J., 1999), stimulieren 2,5 mM  $\text{Fe}^{2+}$  die Enzymaktivität 1000-fach stärker als  $\text{Mg}^{2+}$ . Durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ - anstelle von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen, konnte jedoch keine Aktivität von PphA erreicht werden.

### 5.2.3. Einfluß von Redoxzustand, pH und Salzgehalt auf die PphA Aktivität

Um zu prüfen, ob die Aktivität von PphA vom Redoxzustand abhängig ist, wurde die Dephosphorylierung von PII-P durch 0,4 pmol PphA unter reduktiven und unter oxidativen Reaktionsbedingungen getestet. Der reduktive Ansatz enthielt 5 mM DTT, der oxidative Ansatz wurde unter Verwendung eines Standardreaktionspuffers der 10 min bei 95°C und anschließend über Nacht bei 25°C oxidiert wurde, durchgeführt. Die Aktivität von 75 fmol PphA gegenüber PII-P betrug 100 % im reduzierten Ansatz und 90 % im oxidierten Ansatz. Ein kinetischer Vergleich mit Phosphocasein als Substrat und 60 fmol PphA wies keine Unterschiede in der Geschwindigkeit der Dephosphorylierung auf (Abb. 18). Die Aktivität der PphA ist demnach unabhängig vom Redoxzustand.

Dagegen scheint der pH-Wert die PphA Aktivität zu beeinflussen. Ein kinetischer Vergleich der Dephosphorylierung von Phosphocasein bei pH 7,0, 7,4 und 8,0 zeigt eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem pH-Wert. Eine Messung bei höherem pH-Wert als 8,0 war wegen der Oxidation von  $Mn^{2+}$  und einer damit verbundenen kompletten Hemmung der Enzymaktivität nicht möglich. Bei einem pH- Wert von 7,0 beträgt die Aktivität 57 % derjenigen bei pH 7,4. Bei pH 8,0 ist eine Zunahme um 20 % gegenüber pH 7,4 zu verzeichnen. Da PphA bei dem physiologischen pH von 7,4 äußerst stabil ist und das PII-P Dephosphorylierungssystem bei diesem pH zuverlässig durchgeführt werden kann, wurden alle Dephosphorylierungsreaktionen bei pH 7,4 ausgeführt, obwohl bei diesem pH-Wert das Enzym nicht die maximale Aktivität entfaltet.

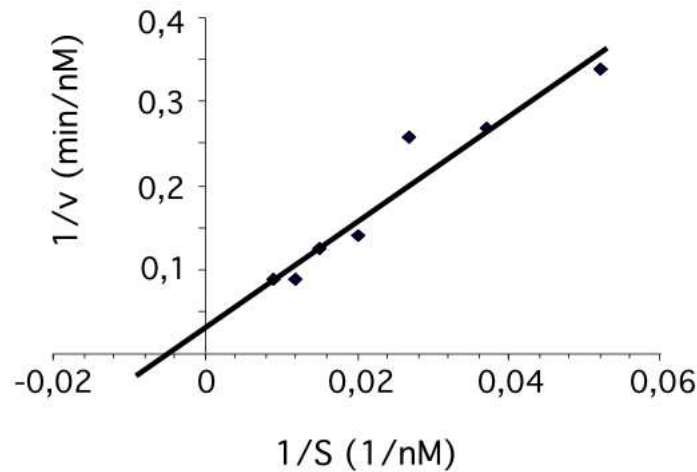
Gegenüber höheren Salzkonzentrationen ist die Aktivität von PphA relativ tolerant. Bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM, dem 3-fachen der im Standardreaktionsgemisch enthaltenen, beträgt die PphA Aktivität 81% im Vergleich zur Kontrolle. Bei 300 mM und 500 mM sinkt die Aktivität auf 63% bzw. 52%.



**Abbildung 18:** Vergleich der Enzymkinetiken von PphA unter oxidativen und unter reduktiven Bedingungen mit dem Substrat Phosphocasein.

### 5.3. Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die kinetischen Konstanten von PphA wurden mit dem gut zu quantifizierenden Phosphocaseintest ermittelt, wobei die Umsatzgeschwindigkeiten bei Substratkonzentrationen von 10 bis 110 nM Phosphocasein durch 50 fmol PphA erfasst wurden. Abbildung 19 zeigt anhand eines Lineweaver-Burk Diagrammes die Abhängigkeit der PphA Aktivität von der Konzentration an Phosphocasein. Aus dem Diagramm läßt sich ein apparenter  $K_M$ -Wert von 200 nM ablesen.  $V_{max}$  wurde auf  $25 \text{ nM min}^{-1}$ , entsprechend  $0,625 \text{ pmol min}^{-1} 50 \text{ fmol}^{-1}$  eingesetzter Enzymmenge (Molekülmasse PphA von 28,4 kD) bestimmt, was einer maximalen Umsetzung von  $12,5 \text{ pmol Phosphocasein min}^{-1} \text{ pmol}^{-1} \text{ Enzym}$  entspricht. Der daraus berechnete  $k_{cat}$  beträgt  $0,2 \text{ s}^{-1}$ . Der Quotient  $k_{cat} / K_M$  beträgt  $1 \times 10^6$ , ein sehr hoher Wert, der darauf hinweist, daß die katalytische Effizienz des Enzyms gegenüber Phosphocasein sehr hoch ist.



**Abbildung 19:** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Substrates Phosphocasein, dargestellt in einem Lineweaver-Burk Diagramm.

#### 5.4. Dephosphorylierung von Oligopeptiden

Bereits der teilgereinigte PII-P Phosphatase-Extrakt aus *Synechococcus* PCC 7942 dephosphorylierte das Oligopeptid Phospho-Kemtid. Gereinigte PphA ist ebenfalls in der Lage synthetische Phosphatasesubstrate umzusetzen.

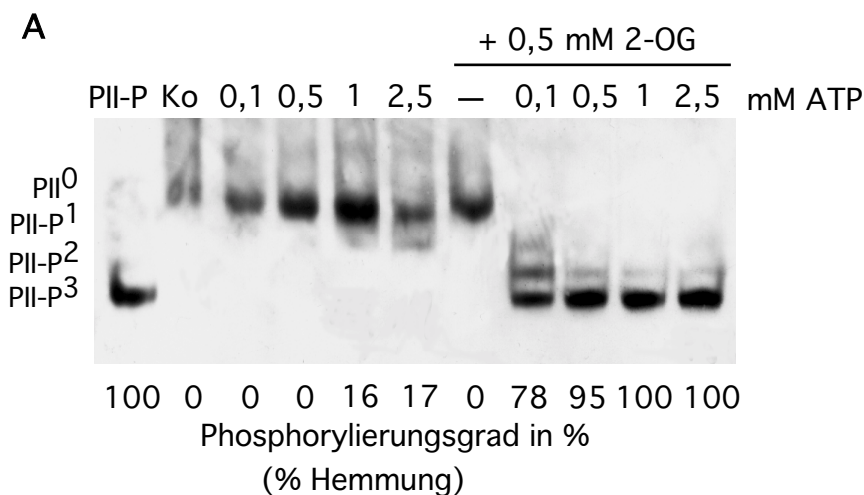
Die Oligopeptidsubstrate S ( $\text{RRA}_{(p)}\text{SVA}$ ) und T ( $\text{RRA}_{(p)}\text{TVA}$ ) werden von PphA mit  $4,4 \text{ pmol min}^{-1} \text{ pmol}^{-1}$  Enzym, bzw. mit  $18,8 \text{ pmol min}^{-1} \text{ pmol}^{-1}$  dephosphoryliert. Phosphothreonin wird dabei ca. 4-fach schneller umgesetzt als Phosphoserin. Auch die Phosphotyrosin enthaltenden Oligopeptidsubstrate  $\text{END}_{(p)}\text{YINASL}$  und  $\text{DADE}_{(p)}\text{YLIPQQG}$  werden mit  $1 \text{ pmol min}^{-1} \text{ pmol}^{-1}$  Enzym dephosphoryliert.

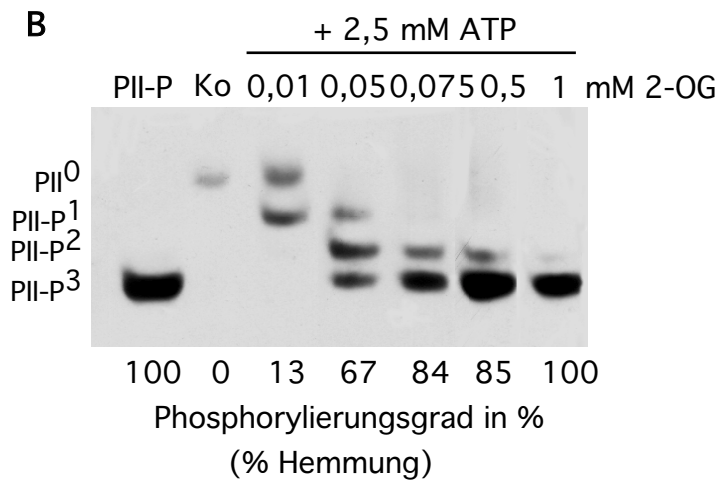


## 5.5. Regulation der PphA

### 5.5.1. Einfluß von ATP und 2-Oxoglutarat auf die Aktivität der PphA

Ebenso wie der teilgereinigte PII-P Phosphataseextrakt aus *Synechococcus*, ist die gereinigte PphA aus *Synechocystis* PCC 6803 in  $Mg^{2+}$ -haltigem Puffer aktiv, d.h. es ist keine weitere Aktivierung der Phosphatase nötig. Die teilgereinigte Phosphatase unterliegt einer Regulation durch eine synergistische Hemmung von ATP und 2-Oxoglutarat. Dieser Regulationsmechanismus konnte auch mit den gereinigten Komponenten, PphA und PII-P *in vitro* genau nachgewiesen werden. Abbildung 20 A zeigt, daß 0,4 pmol PphA durch 1 und 2,5 mM ATP schwach, zu 16 % bzw. 17 % gehemmt werden. 0,5 mM 2-Oxoglutarat alleine hat keinen Hemmeffekt. Jedoch hemmen 0,5 mM 2-Oxoglutarat in Anwesenheit von 0,1 mM ATP die Dephosphorylierung zu 78 % und von 0,5 mM ATP zu 95 %. In Anwesenheit von 2,5 mM ATP wird durch 0,075 mM 2-Oxoglutarat eine 84 %-ige Hemmung bewirkt und bereits 10  $\mu$ M 2-Oxoglutarat zeigen einen ca. 13 %-igen Hemmeffekt (Abb.20 B). 0,05 mM 2-Oxoglutarat und 0,05 mM ATP hemmen 0,4 pmol PphA noch synergistisch zu 80 %. Der inhibitorische Synergismus von ATP und 2-Oxoglutarat ist nur für das Substrat PII-P nachzuweisen. Bei Phosphocasein als Substrat, ist weder mit ATP oder 2-Oxoglutarat, noch mit beiden Substanzen gemeinsam eine inhibitorische Wirkung nachweisbar (Abb. 22 B und C). Der spezifische Hemmeffekt von ATP und 2-Oxoglutarat wird demnach auch hier über das Substrat PII-P und dessen Ligandierung vermittelt.



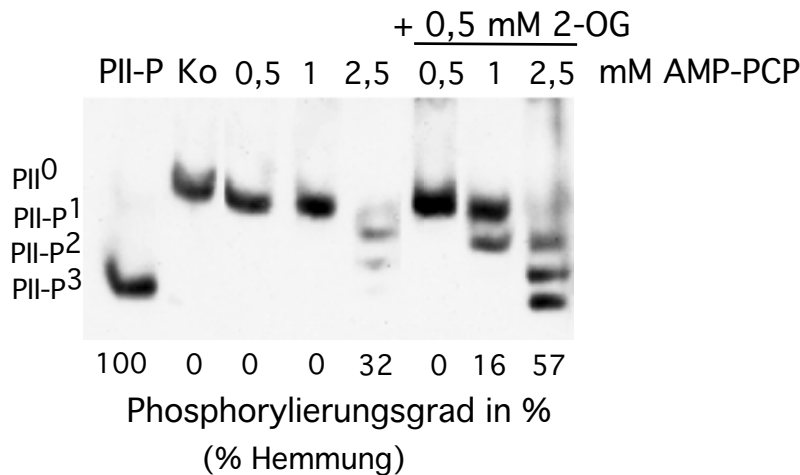


**Abbildung 20:** Synergistischer Hemmeffekt von ATP und 2-Oxoglutarat auf die Dephosphorylierung von PII-P durch 0,4 pmol PphA. Der Phosphorylierungsgrad entspricht hier dem Hemmeffekt. **A:** Wirkung von ansteigenden Mengen ATP in An- und Abwesenheit von 0,5 mM 2-Oxoglutarat. **B:** Wirkung von ansteigenden Mengen 2-Oxoglutarat in Anwesenheit von 2,5 mM ATP.

### 5.5.2. Wirkung von weiteren Nukleotiden und 2-Oxoglutarat

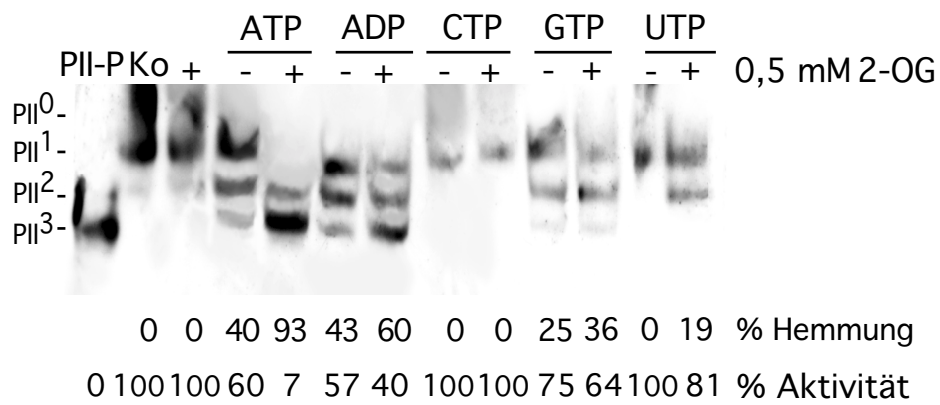
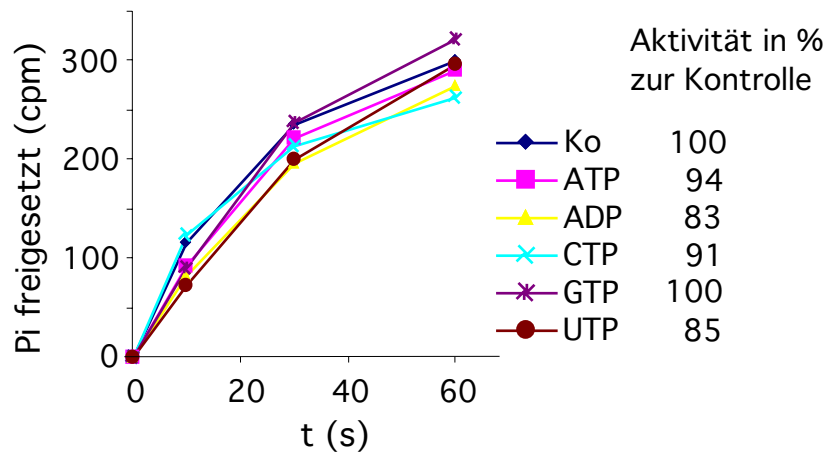
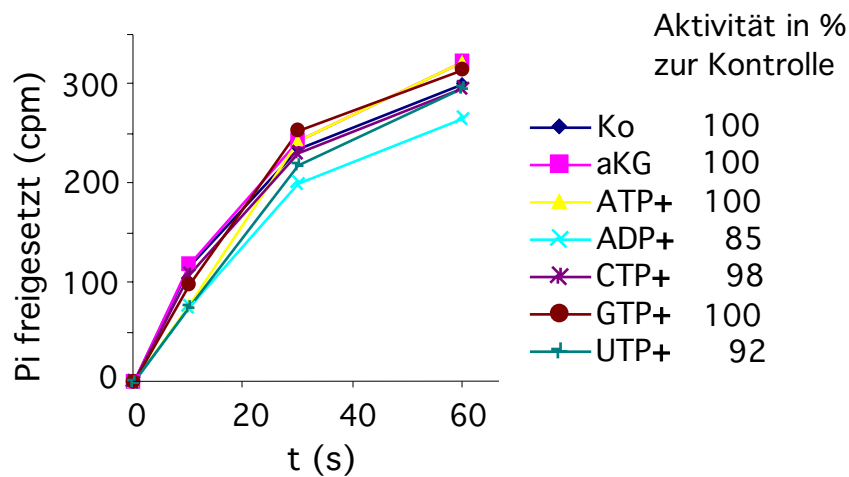
#### Effekt von AMP-PCP

Das aufgrund eines C Atoms zwischen der  $\beta$  und  $\gamma$  Phosphatgruppe nicht hydrolysierbare ATP- Analogon AMP-PCP ist in der Lage, partiell die Dephosphorylierung von PII-P zu hemmen (Abb. 21). 2,5 mM AMP-PCP alleine bewirken eine 32 %-ige Hemmung. Ein synergistischer Effekt mit 0,5 mM 2-Oxoglutarat bewirkt bei 1 mM AMP-PCP eine 16 %-ige und bei 2,5 mM eine 57 %-ige Hemmung der Dephosphorylierung bei einer PphA Konzentration von 0,4 pmol. Im Vergleich zur synergistischen Hemmung durch ATP und 2-Oxoglutarat, bei der 1 mM ATP und 0,5 mM 2-Oxoglutarat eine 100%-ige Hemmung bewirken, wirkt AMP-PCP deutlich schwächer. Möglicherweise läßt ein ungünstiger Bindungswinkel von P-C-P keine stabile Bindung an PII-P zu. Für die Hemmung der Dephosphorylierung ist jedoch offensichtlich keine Hydrolyse von ATP erforderlich.



**Abbildung 21:** Hemmung der Dephosphorylierung von PII-P durch AMP-PCP in Ab- und Anwesenheit von 0,5 mM 2-Oxoglutarat. Der Phosphorylierungsgrad entspricht hier dem Hemmeffekt

Wenn keine Hydrolyse von ATP, sondern die Ligandierung für die synergistische Hemmung der Dephosphorylierung nötig ist, könnten auch andere Nukleotidtriphosphate dieselbe Wirkung erzielen. Diese Annahme wurde mittels der Dephosphorylierung von PII-P und von Phosphocasein überprüft. Abbildung 22 A zeigt die prozentuale Hemmung durch Nukleotide in An- und Abwesenheit von 0,5 mM 2-Oxoglutarat mit dem Substrat PII-P. Zum Vergleich mit den Kinetiken aus Abb. 22 B und C wurde hier ebenfalls die Aktivität in % zur Positivkontrolle (ohne Additiv) angegeben. Die Aktivität von 0,1 pmol PphA wird bereits durch je 1 mM ATP und ADP zu 40 % bzw. 43 % und durch GTP zu 25 % gehemmt. CTP und UTP alleine haben keinen Hemmeffekt. In Anwesenheit von 0,5 mM 2-Oxoglutarat ist ein fast vollständiger, synergistischer Hemmeffekt von 93 % mit ATP erkennbar, bei ADP erfolgt eine partielle Hemmung von 60 % und bei GTP von 36 %. UTP zeigt als einziges Nukleotid nur in Anwesenheit von 2-Oxoglutarat einen Hemmeffekt von 19 %, während CTP auch hier keine Wirkung hat.

**A****B****C**

**Abbildung 22:** Einfluß von 1 mM Nukleotidphosphaten in An- und Abwesenheit von 0,5 mM 2-Oxoglutarat auf die Dephosphorylierung von **A:** PII-P; **B:** Phosphocasein ohne und **C:** Phosphocasein mit 2-Oxoglutarat (aKG). Die Aktivitäten in % zur Kontrolle bei B und C wurden aus den 30 s Werten der Kinetiken berechnet.

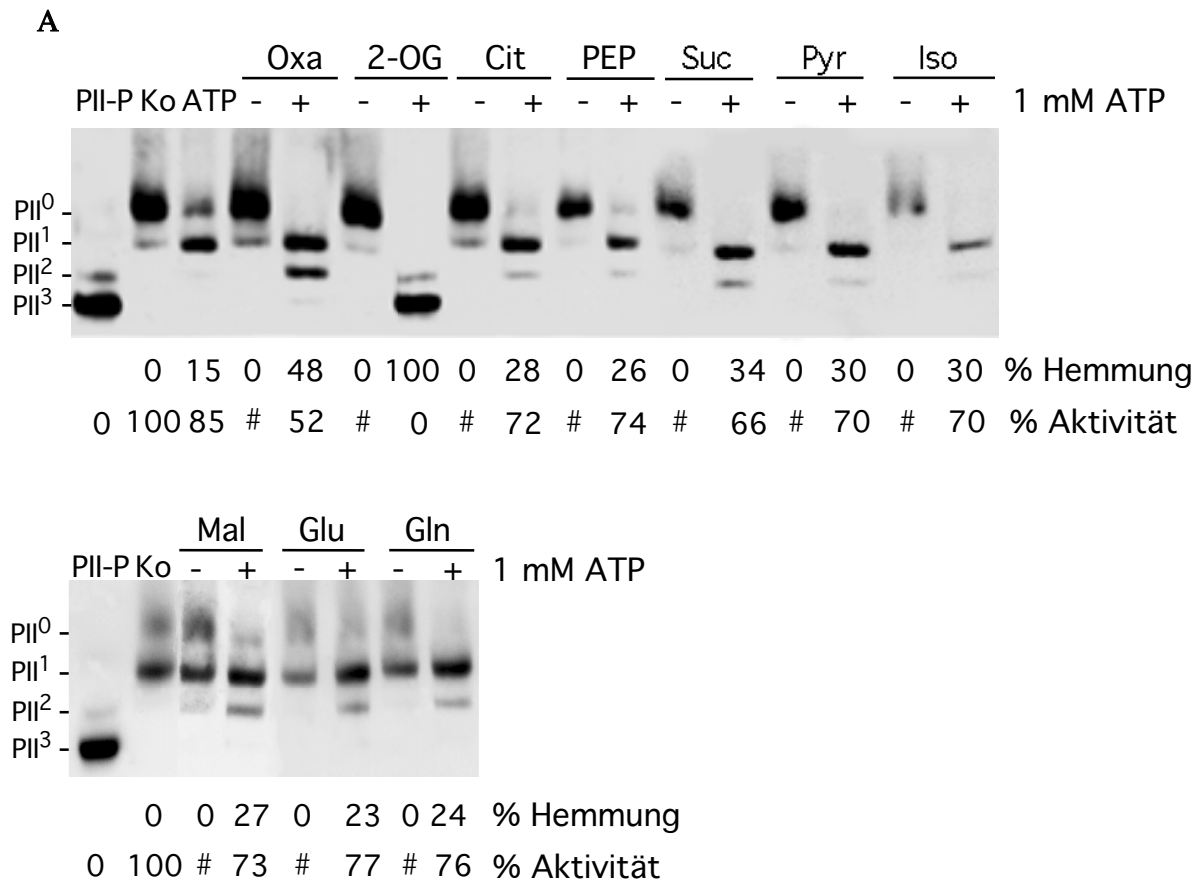
Aus den Kinetiken in Abb. 22 B und C geht hervor, daß 1 mM eines jeden Nukleotidphosphates die Dephosphorylierung von Phosphocasein durch 60 fmol PphA nicht signifikant beeinträchtigen. Im Gegensatz zu PII-P bewirkt hier die Anwesenheit von 0,5 mM 2-Oxoglutarat in keinem Falle eine Verstärkung des Hemmeffektes. Zum direkten Vergleich sind die Aktivitäten auch prozentual zur Kontrolle angegeben.

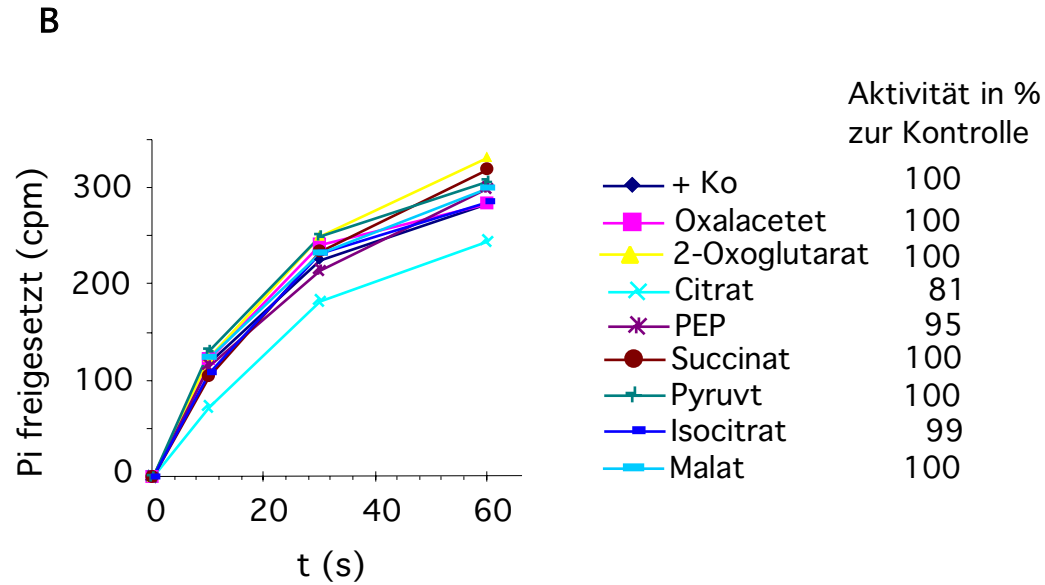
Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität von PphA nicht direkt sondern über das Substrat PII-P reguliert wird, wobei außer ATP auch ADP, GTP und UTP eine partiell inhibierende Wirkung zeigen.

### **5.5.3. Wirkung von Metaboliten des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels**

2-Oxoglutarat, das Bindeglied zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsel, kann synergistisch mit ATP die PII Kinase aktivieren und die PII-P Phosphatase, PphA, hemmen. Möglicherweise wirken weitere Metaboliten, z.B. des Tricarbonsäurezyklus oder des Stickstoffstoffwechsels hemmend auf die Dephosphorylierung. Die Wirkung könnte, wie im Fall der Nukleotidphosphate, über das Substrat PII-P vermittelt werden oder die Metaboliten könnten direkt an der Phosphatase angreifen. Um dies zu unterscheiden, wurde wieder die Dephosphorylierung von PII-P und von Phosphocasein untersucht. Abbildung 23 A zeigt die Wirkung von 10 Substanzen des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels auf die Dephosphorylierung von PII-P durch 75 fmol PphA in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP. Zum besseren Vergleich mit den Kinetiken aus Abb. 23 B wurde auch wieder die Aktivität in % zur Kontrolle (ohne Additiv) angegeben. Je 0,5 mM jeder Substanz wurden in den Test eingesetzt. In keinem Fall ist eine hemmende Wirkung durch eine Substanz alleine nachweisbar. Wie gezeigt, hemmt ATP die Dephosphorylierung bereits um ca.15 %. In allen Fällen wird die Dephosphorylierung synergistisch durch ATP und Metabolit reduziert, wobei 2-Oxoglutarat, als Positiv Kontrolle, die Dephosphorylierung zu 100 % und Oxalacetat zu 48 % hemmen. Die anderen Metaboliten, Citrat, Phosphoenolpyruvat, Succinat, Pyruvat, Isocitrat, Malat, Glutamat und Glutamin weisen eine intermediäre Hemmwirkung von 23 % bis 34 % in Anwesenheit von ATP auf. Abbildung 23 B zeigt die Wirkung derselben Substanzen auf die Dephosphorylierung von Phosphocasein durch 60 fmol PphA. Der Test ist hier ohne ATP gezeigt, da eine direkte Wirkung auf PphA detektiert werden sollte. Ein synergistischer Effekt von ATP und 2- Oxoglutarat auf die Dephosphorylierung von Phosphocasein konnte nie nachgewiesen werden (Abb.22 B). Die prozentualen Aktivitäten

wurden anhand der 30 s Werte der Kinetiken berechnet. Nur bei Citrat wird die Aktivität auf 81 % reduziert, möglicherweise besteht hier eine schwache Hemmwirkung direkt auf PphA. Alle anderen Substanzen zeigen keinen Unterschied zur Kontrolle. Die teilweise inhibitorische Wirkung einiger Metaboliten wird demnach ebenfalls über das Substrat PII vermittelt. PphA scheint nicht direkt über die Metaboliten reguliert zu werden.





**Abbildung 23:** Wirkung von 0,5 mM Metaboliten des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP auf die Dephosphorylierung von **A:** PII-P, #, entspricht Positiv Kontrolle; **B:** Phosphocasein ohne ATP. Die Aktivitäten in % zur Kontrolle in B wurden aus den 30 s Werten der Kinetiken ermittelt.

## 6. Die PP2C Phosphatase PphA - Sequenzvergleich und Stammbaumanalyse

Protein Serin/Threonin Phosphatasen der PPM Familie vom Typ PP2C sind durch elf Aminosäuresequenzmotive charakterisiert, die in Eukaryonten und Eubakterien konserviert sind und sich über den gesamten katalytischen Bereich von bis zu 290 Aminosäuren erstrecken. (Bork et al., 1996). Ein kleines Protein, wie PphA, besteht demnach fast nur aus der katalytischen Domäne. Das codierende Gen von PphA, *sll1771*, wurde bereits von Shi et al. (1998) aufgrund dieser Motive der Gruppe der PP2C-Phosphatasen zugeordnet. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von PphA mit in Datenbanken vorliegenden Sequenzen sollte nun ähnliche Phosphatasen in anderen Organismen aufspüren. Eine Vielzahl von meist putativen PP2C-Phosphatasen aus Bakterien und aus Eukaryonten mit bis zu 55 % Identität zu PphA wurde dabei gefunden und einige ausgewählte Sequenzen wurden verglichen. In Abb. 24 A sind die Sequenzen von PphA und den beschriebenen PP2C-Phosphatasen Pph1 aus *Myxococcus xanthus* (Treuner-Lange et al, 2001) und PrpC aus *Bacillus subtilis* (Obuchowski et al., 2000), sowie 5 weiteren putativen PP2C-Phosphatasen mit der humanen PP2C $\alpha$ , als dem klassischen, eukaryontischen und am besten charakterisierten Vertreter verglichen. Die einzelnen PP2C Motive sind innerhalb der Bakteriengruppe sehr einheitlich und enthalten wesentlich mehr identische Aminosäuren als nur die in allen PP2C-Phosphatasen konservierten Reste. Die Sequenz von PP2C $\alpha$  hebt sich dabei deutlich ab. Die von Das et al. (1996) postulierten 10 invarianten Reste, die sich hauptsächlich an der Bindung der Metallionen und der Erkennung der Phosphatgruppe beteiligen, sind in PphA ebenfalls konserviert. Die Sequenzidentitäten zu PphA sind für den ORF c279 aus *Anabaena* PCC 7120 mit 55 % und dem translatierten ORF 3387 aus *Nostoc punctiforme* mit 54 % am höchsten. Zur humanen PP2C $\alpha$  besteht lediglich eine Identität von 13%, ein sehr geringer Wert, der auf die hohe Divergenz innerhalb der PP2C Superfamilie hinweist.

In Anlehnung an die von Treuner-Lange et al. (2001) in drei Gruppen geordnete PP2C-Phosphatasefamilie, wovon Gruppe I und III bakterielle und Gruppe II eukaryontische Vertreter enthalten, wurde ein Stammbaum, ausgehend von der Sequenz von PphA erstellt. Wie der Stammbaum in Abb. 24 B zeigt, befindet sich PphA in der Subfamilie I der bakteriellen PP2C-Phosphatasen, die, bis auf wenige Ausnahmen, kleine Proteine mit ca. 250 Aminosäureresten enthält. Die katalytische Domäne dieser kleinen Phosphatasen erstreckt sich also über das gesamte Protein. Ebenfalls in diese Gruppe gehören Pph1 aus *Myxococcus xanthus* und PrpC aus *Bacillus subtilis*. Die Proteine der Gruppe III bakterieller PP2C-



Phosphatasen, die SpoIIE und RsbU aus *Bacillus subtilis*, slr 0114, RsbU (*slr2031*), IcfG (*slr1860*), slr 1365 und slr 1983 aus *Synechocystis* 6803 T enthält, bestehen meist aus mehr als 450 Aminosäureresten und enthalten, wie z.B. SpoIIE, eine N-terminale Transmembrandomäne oder wie slr 1983, eine putative Regulatordomäne. Mit einer BLASTP-Datenbankanalyse, bei der die Aminosäuresequenz von PphA als Suchsequenz eingesetzt wurde, wurden die PP2C-Phosphatasen der Gruppe III nicht erfaßt. Um eine Einordnung aller bekannten putativen PP2C-Phosphatasen aus *Synechocystis* 6803 T zu erhalten, wurden sie dennoch für die Stammbaumanalyse aufgenommen. Diese Phosphatasen wurden von Zhang et al. (1998) als putative PP2C definiert, zeigen aber nur geringe Identität mit PphA, die auf die essentiellen Phosphatasemotive beschränkt ist.

Wie der Stammbaum zeigt, sind diese Phosphatasen phylogenetisch entfernter von Gruppe I und näher den eukaryontischen Vertretern der PP2C-Phosphatasen angesiedelt.

## A

S.coccus leo., Hyp	18>-----AADERTAMLSLSLAQMEVAATTDVGMRRSQNEDFYVYHY	56
S.cystis, sll1033	366> INPVTMPDVNVFDSEEVDDVPTAVLPMQLISLVDAGYTDGRGHRQHNEEFFGITT	420
S.cystis, PphA	-----MTEVNLSVSCSSTGKTDPLVFRQYNQDSFYLDLP	33
Anabaena sp., c279	-----MKLNFTGHTDPLIRSNQDDYYIDP	25
N.punct., 3387	-----MKLNFTGFSDPGLIRSNQDAYYVDP	25
D.radiodurans, Hyp	-----MASASSPFLVTGLLTDVGRQRAGGANQDAALALP	33
M.xanthus, Pph1	-----MRIEVAGSTHVGMKRNHNEDNFLMLP	25
B.subtilis, PrpC	-----MLTALKTDGKIRQHNEEDDAGIFK	23
Human PP2C $\alpha$	-----MGAFLDKPKMEKHNAQQGNGRLRYGLSSMQGWRVEMEDAHTAVI	44

S.coccus leo., Hyp	QLEHLETPSGTSVQAKGLFLVLC	2	3	109
S.cystis, sll1033	SVETHRNHNGKTIKAQGVYVVC	2	3	473
S.cystis, PphA	EG-----RFFIVADGMG	2	3	72
Anabaena sp., c279	EG-----RFFIVADGMG	2	3	64
N.punct., 3387	EG-----RFFVVDGMG	2	3	63
D.radiodurans, Hyp	LPG-----GLYAVADGMG	2	3	71
M.xanthus, Pph1	EEF-----LFCVADGMG	2	3	71
B.subtilis, PrpC	GKD-----EFILAVVADGMG	2	3	66
Human PP2C $\alpha$	GLP-----SGLESWSFFAVYDGHAGSQVAKYCCEHLLDHITNQDFKGSAG	2	3	90

S.coccus leo., Hyp	----ELPSREALRSAVLAANQALFELN--QAAVSGSDRMGTTLVAILLQ--GTRVAIIHV	4	5	162
S.cystis, sll1033	----RLPDKNITITEGINLANQKIYEVN--QSNASSGSGRMGTTLVMLVK--DTTMAIAHV	4	5	526
S.cystis, PphA	----EITSEQLLRDALMDANEGILED--QKINLERRDMGTTAVLIAFR--EAGAWRAHV	4	5	123
Anabaena sp., c279	----SKPSSELLEQALWQANEAILQD--QONHPERADMGTAVVIFRND--WCAHV	4	5	115
N.punct., 3387	---SSKSSQELLEQALWGANEAILQD--QONHPERADMGTAVVIFRAPE--SPWCAHV	4	5	116
D.radiodurans, Hyp	----RSRPPARLIEAVQAANLAVVQR--AVG--ELVGMGTTLLVAID--RGAALIAHV	4	5	120
M.xanthus, Pph1	MDKTRNYDENRLATGVKLANARIFEK---ACSESKYKMGTTIVTVHFS--QSAVVYGHV	4	5	127
B.subtilis, PrpC	--TAPSECEKWLIEQILSVNSKIYDH--QAHEECQMGTTIVCALFT--GKTVSVAHI	4	5	119
Human PP2C $\alpha$	----APSVENVKNGIRTGFLEIDHMRVMSEKKHGADRSGSTAVGVLLIS--PQHTYFINC	4	5	144

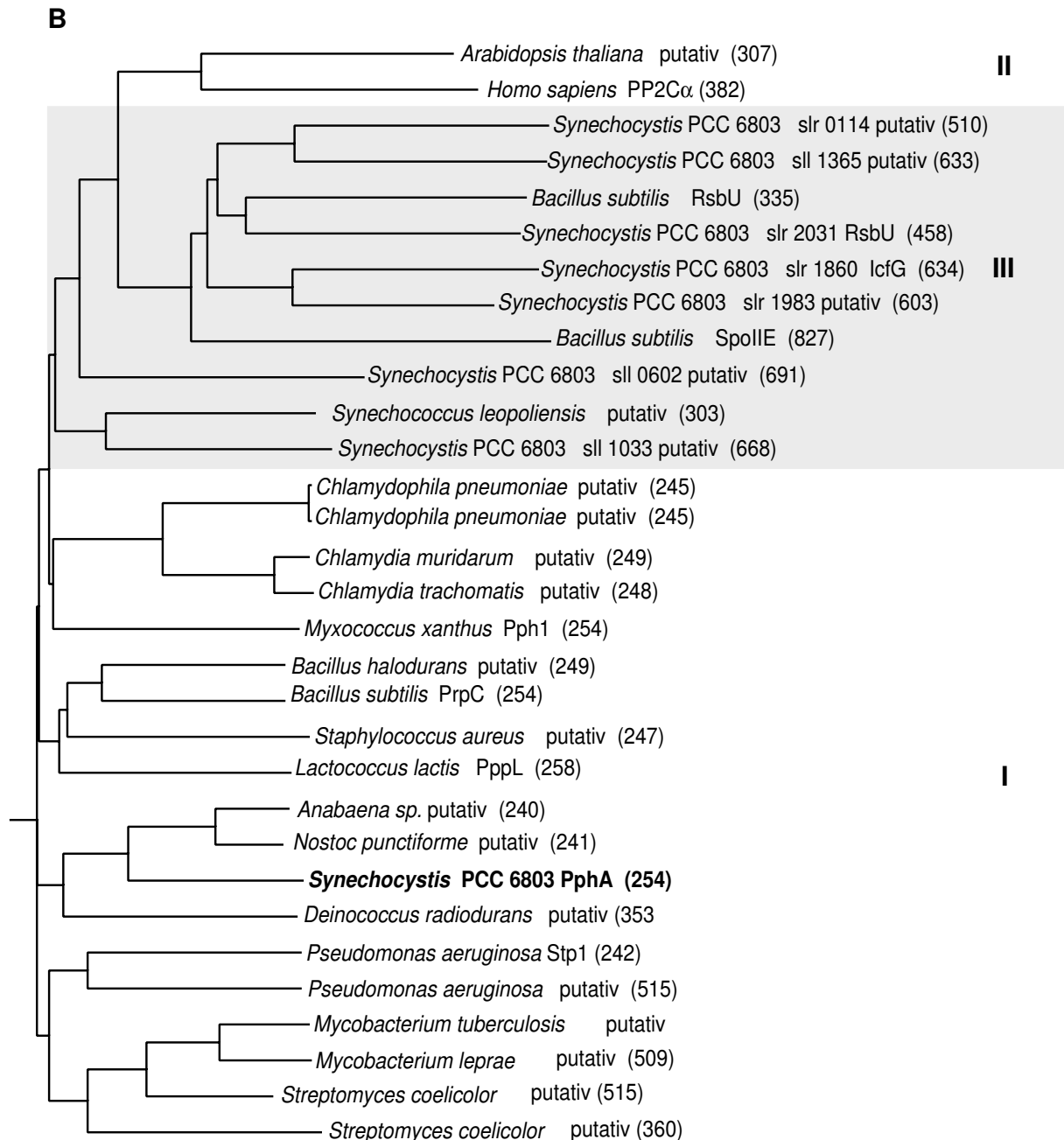
S.coccus leo., Hyp	GDSRAYRYSRLTGLDQLTRDHEVGQIAIAQG--VDPDVAY--ARPEAHQLTQALGPRNND	6	215
S.cystis, sll1033	GDSRIYRVTRKNGLEQLTVDEHVGQAILNG--LDPTLAY--ARPDAYQLTQALGPHSSS	6	579
S.cystis, PphA	GDSRLYRLRN--QQLERVTEHTWVARALKMGDIDPAQAK--VHPWRHVLFQCLGRQDLN	6	174
Anabaena sp., c279	GDSRLYRLRE--TQLEQVTEHTWVARAIKIGDITAEAR--VHPFRHVLSRCLGREDLH	6	166
N.punct., 3387	GDSRLYRFRE--SHLEQVTEHTWVARAIKIGDITLDEARSHFRH--VLSRCLGREDLH	6	167
D.radiodurans, Hyp	GDSRAYLLRG--GELLRLTDDHSWVAEQVRMGMLEAEAR--HHQWRSVVSNALGGEERV	6	171
M.xanthus, Pph1	GDSRVYYFRG--GALKQVTEHSLNDYLLKAKKLSPEEIE--NFPKHNIVIRALGMKENV	6	178
B.subtilis, PrpC	GDSRCYLLQD--DDFVQVTEHSLVNLVLTGEISREDAE--HHPRKNVLTALGTDQLV	6	170
Human PP2C $\alpha$	GDSRGLLCRN--RKVHFFTDQHKPSNPLEKRIQNAAGGSVMICRVNGSLAVSRALGDFDYK	6	203

S.coccus leo., Hyp	-----WLDPEVRFLEVR--EDTVFLLCSDGLSDFDI--VEEVTETHVAPLLQTRT	7	8	9	264
S.cystis, sll1033	-----YLQPDVAIFEIE--EDCLILLCSDGISDNDFVEEHWQELLPLPVSSSQ	7	8	9	628
S.cystis, PphA	-----FIEVEALDAQ--PGDTFMMCS--DGLTEEVP--DNLIEKILTGQGN	7	8	9	218
Anabaena sp., c279	-----QVDVQPLDTK--IGDRLLLCSDGLTEELPDQKIAHNLIQINSI	7	8	9	210
N.punct., 3387	-----QIDVQPLDVK--AGDRLLLCSDGLT--EELVEQKITSCLOQAP	7	8	9	211
D.radiodurans, Hyp	-----RLELFGLELQ--GGDRLLLCSDGLSGVVSEAEALLSLLAQPQA	7	8	9	215
M.xanthus, Pph1	-----QVDVSRVEPQ--EDDVFLLCSDGLSGMVTDAQMQEILQRTPE	7	8	9	222
B.subtilis, PrpC	-----SIDTRSFIDIE--PGDKLLLCSDGLTNKVEGTELKDILQSDSA	7	8	9	214
Human PP2C $\alpha$	CVHVGKGPTEQLVSP--EPEVHDIERS--EDDQFIILACDGIWDVMGNEELCDFVRSRLVTD	7	8	9	262

S.coccus leo., Hyp	SLQYGIQQLVEIANEAGGH--DNITVAVRLR--LRPQLGPVI	10	11	303
S.cystis, sll1033	DVDRGLRKLMEAAANEYNGH--DNLTGVLVRLKVRPQIPLDVW	10	11	668
S.cystis, PphA	-CDDQAVQLIEEAKNAGGSDNITIVLVDFSEDNQDS	10	11	254
Anabaena sp., c279	-LDQSALSLVEDAKEQG--GH--DNITVIVALE	10	11	240
N.punct., 3387	WLDKAAISLIEAAKEHGGH--DNITVIVISLE	10	11	241
D.radiodurans, Hyp	-PQDIAAQLEIAANDAGG--DNITAVVVDVLR--SQRLPSYPLPESPGDGPEYAEVLLST>79	10	11	275
M.xanthus, Pph1	-LEKACSQLIDMANAAGGNDNITVCVLARYHAA	10	11	254
B.subtilis, PrpC	-PQEKVNLLVDKANQNGG--DNITAVLLELALQVEEGEDQC	10	11	254
Human PP2C $\alpha$	DLEKVCNEVVDTCLYKGS--DNITMSVILICF--NAPKVSPEAVKKEAELDKYLECRVEGG >5	10	11	322



**Abbildung 24: A:** Aminosäuresequenzvergleich von PphA mit weiteren PP2C-Phosphatasen. Die elf Phosphatasemotive sind eingerahmt und nummeriert, konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt; Hyp., hypothetisches Protein. Die Aminosäuresequenzidentitäten zu PphA betragen für *Synechococcus leopoliensis* Hyp. 34 %, *Synechocystis* 6803T sll1033 30 %, *Anabaena* sp. ORF 2136 c279 55 %, *Nostoc punctiforme* ORF 3387 54 %, *Deinococcus radiodurans* Hyp. 42 %, *Myxococcus xanthus* Pph1 34 %, *Bacillus subtilis* PrpC 34 % und humane PP2C $\alpha$  13 %. **B:** Phylogenetischer Baum der PP2C-Phosphatasen ausgehend von PphA. In Klammern ist die Länge des ORF's in Aminosäureresten angegeben.

Zugangsnummern (Accession Numbers) von oben nach unten:

Gruppe II: BAB08417, P35813; Gruppe III: BAA10651, BAA18661, L35574, BAA17283, P37979, BAA18228, P37475, BAA10367, CAB65437, BAA16771; Gruppe I: AAF73659, C72085, G81693, E71538, AF223364, BAB06224, G69878, CAB60748, CAA10712, RAN02136, RNPU03387, **BAA17671**, H75265, A83438, E83637, H70699, T10013, T36714, CAB90888.

## D. Diskussion

### 1. MPphA, die PII-P Phosphatase defiziente Mutante aus *Synechocystis* PCC 6803 T

Erste biochemische Analysen eines teilgereinigten PII-P Phosphatase-Extraktes aus *Synechococcus* PCC 7942 zeigten bereits die synergistische Hemmwirkung von ATP und 2-Oxoglutarat, die über das Substrat PII vermittelt wird. Das Inhibitionsmuster und die Aktivierung durch  $Mg^{2+}$ -Ionen ließen eine Phosphatase eukaryontischen Typs, eine PP2C-Phosphatase vermuten. Für weiterführende biochemische Untersuchungen zur Regulation sollte diese Phosphatase gereinigt werden. Trotz erheblichen Aufwands gelang eine Reinigung der PII-P Phosphatase aus *Synechococcus* PCC 7942 Zellen nicht. Deshalb wurde ein genetischer Ansatz gewählt um die PII-P Phosphatase zu identifizieren. Das komplett sequenzierte Genom von *Synechocystis* PCC 6803, eines nahen Verwandten von *Synechococcus* PCC 7942 bot diese Möglichkeit. Mittels reverser Genetik wurden putative Phosphatasen inaktiviert und die erhaltenen Mutanten wurden *in vivo* auf die Fähigkeit der Dephosphorylierung von PII-P nach Zugabe von Ammonium analysiert. Die Mutante (MPphA), die den inaktivierten offenen Leserahmen *sll1771* (*pphA*) enthielt, zeigte den erwarteten Phänotyp, nämlich die Unfähigkeit einer schnellen Dephosphorylierung von PII-P nach Ammoniumgabe. MPphA zeigt auch unter allen weiteren Bedingungen, die eine schnelle Dephosphorylierung von PII-P bedingen, wie z.B. Hemmung der  $CO_2$  Fixierung, oxidativer Stress und Permeabilisierung keine oder nur eine äußerst langsame Dephosphorylierung von PII-P. PphA ist somit die einzige spezifische PII-P Phosphatase, die eine schnelle Dephosphorylierung von PII bewirken kann. Die dennoch stattfindende, sehr langsame Dephosphorylierung von PII-P wird vermutlich durch unspezifische,  $Mg^{2+}$ -unabhängige Phosphatasen verursacht. Hierbei könnte es sich um Alkalische Phosphatasen handeln, von denen drei im Genom von *Synechocystis* PCC 6803 identifiziert wurden, da auch *in vitro* PII-P durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert werden kann.

### Wachstum mit Nitrat und Ammonium

Unter Standardbedingungen, bei Wachstum in BG11<sup>N</sup> oder BG11<sup>A</sup> Medium, weist MPphA ein um ca. 15 % beschleunigtes Wachstum gegenüber dem Wildtyp auf, ist unter Laborbedingungen sehr robust und scheint besonders in der lag-Phase lichtunempfindlicher

zu sein als der Wildtyp. Der Phosphorylierungsgrad von PII ist bei Wachstum in BG11<sup>N</sup> sehr hoch (PII<sup>3,2</sup>) und entspricht demjenigen des Wildtyps bei Stickstoffmangel. Auch in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Medium liegt PII meist phosphoryliert, mit den Formen PII<sup>2,1,0</sup> vor. Ähnlich der PII defizienten Mutante MP2 (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995), ist bei MPphA die Aktivität der Nitratreduktase um ca. ein Drittel erhöht und es wird auch Nitrit ausgeschieden. Möglicherweise ist die erhöhte Nitratreduktaseaktivität, bei gleichzeitig normaler Aktivität von Nitritreduktase und Glutaminsynthetase, ausreichend für eine Akkumulation von Nitrit, das ausgeschieden wird um die Zelle nicht zu vergiften.

Bei *Synechococcus* PCC 7942 bewirkt die Hemmung der CO<sub>2</sub> Fixierung durch DL-GA einen Stopp der Nitrat-abhängigen O<sub>2</sub> Entwicklung, der durch die Dephosphorylierung von PII vermittelt wird (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995). Gemäß Romero et al. (1985) wird die CO<sub>2</sub>-abhängige Nitratverwertung über die Aufnahme von Nitrat reguliert. Untersuchungen von Charlotte Conzelmann (persönliche Mitteilung) zur Nitrataufnahme in *Synechocystis* Wt und MPphA zeigten, daß nach Ammoniumzugabe die Nitrataufnahme in der Mutante, trotz phosphoryliertem PII, ebenso schnell reduziert wird wie im Wildtyp, dessen PII unter diesen Bedingungen sofort dephosphoryliert wird. Bei MPphA würde also phosphoryliertes PII die Nitrataufnahme verhindern. Lee et al. (2000) beschreiben Ähnliches für *Synechococcus* MP2-D und MP2-E, *glnB* Mutanten, die anstelle des phosphorylierbaren Serin 49 ein Aspartat, bzw. Glutamat tragen und phosphoryliertes PII vortäuschen. Diese Mutanten sind zu einer ammoniumabhängigen Regulation des Nitrataufnahmesystems fähig, was ebenfalls mit dem Ligandierungszustand von PII mit 2-Oxoglutarat erklärt wird.

Zu keiner Nitrataufnahme fähig ist MP2-A, eine *glnB* Mutante, die Alanin anstatt Serin 49 enthält und die PII nicht phosphorylieren kann. MP2 dagegen nimmt Nitrat auch in Anwesenheit von Ammonium auf, was zu der Vermutung führte, daß nicht phosphoryliertes PII an der ammoniumvermittelten Hemmung der Nitrataufnahme beteiligt ist (Lee et al., 1998). Die Hemmung der Nitrataufnahme trotz phosphoryliertem PII Protein erscheint plausibel, wenn man den Ligandierungszustand von PII-P miteinbezieht, der sehr schnell auf Änderungen der Metabolitenkonzentration reagiert. Die Hemmung der CO<sub>2</sub> Fixierung oder die erhöhte Ammoniumassimilation in Anwesenheit dieser Stickstoffquelle verursacht ein Absinken des 2-Oxoglutarat-Pools in der Zelle, wodurch PII frei von dem Liganden 2-Oxoglutarat wird. Im Wildtyp würde PII-P durch die PII-P Phosphatase PphA dephosphoryliert werden, was in MP2-D, MP2-E und in MPphA nicht möglich ist. Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß die Nitrataufnahme durch ligandenfreies PII, unabhängig vom Phosphorylierungsgrad, gehemmt wird.

Ein möglicher Rezeptor der Nitrat/Nitrit-Permease für das PII-Signal könnte die C-terminale Domäne von NrtC sein, die für die ammoniumvermittelte-Repression des Transports verantwortlich ist (Kobayashi et al., 1997). In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten müßte sowohl phosphoryliertes, nicht-ligandiertes PII, wie es bei MPphA nach Ammoniumzugabe vorliegt, als auch nicht-phosphoryliertes PII, unabhängig vom Ligandierungszustand an den Rezeptor binden und die Nitrataufnahme hemmen.

### **Monocistronische Transkription von PphA**

*PphA* (*sll1771*) liegt eng benachbart zu *sll1770*, das eine putative Kinase der ABC1-Familie codiert (Leonard et al., 1998) und zu *sll1772*, das ein *mutS* Homologes codiert, im bakteriellen Chromosom (Kaneko et al., 1996). Dennoch wird *pphA* als monocistronische RNA konstitutiv bei Wachstum in  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NH}_4^+$  Medium transkribiert. Ein potentieller Promoter mit einer  $-10$  Region von TTAAA und einer  $-35$  Region von TTGGAA findet sich stromaufwärts des Genanfangs von *pphA*. Zu einer Aufklärung würde die Bestimmung des 5' Endes der mRNA führen. *Pph1* aus *Myxococcus xanthus* wird ebenfalls monocistronisch transkribiert, wobei in Abhängigkeit des Entwicklungszyklus zwei Promotoren verwendet werden. In *Pseudomonas aeruginosa* werden die PP2C-Phosphatase *stp1* und die direkt unterhalb lokalisierte Kinase eukaryontischen Typs *stk1* kotranskribiert. Ein zugehöriges Substrat ist nicht bekannt (Mukhopadhyay et al., 1999). Ob in *Synechocystis* PCC 6803 die putative Kinase, welche durch *sll1770* codiert wird, die PII-Kinase darstellt und PII phosphoryliert, konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (K. Forchhammer, persönliche Mitteilung). In Cyanobakterien wird *glnB* (PII-Protein) unter Stickstoffmangelbedingungen zusätzlich NtcA abhängig transkribiert (García-Domínguez et al., 1997). Eine NtcA-Bindestelle für *pphA* konnte jedoch bis  $-100$  Nukleotide oberhalb des Genanfangs nicht identifiziert werden, so daß eine zusätzliche Transkription unter Stickstoffmangelbedingungen trotz der erhöhten Menge des Substrates PII unwahrscheinlich ist.

## Wachstum bei niedriger CO<sub>2</sub> Konzentration

Ein interessanter Phänotyp von MPphA bei Wachstum bei niedriger CO<sub>2</sub> Konzentration in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Medium ist ein teilweises Ausbleichen der Zellen nach ca. fünf Tagen, eine durch Nährstoffmangel, in diesem Falle Kohlenstoff, induzierte Chlorose, wie sie von Miller und Holt (1977) für *Synechococcus lividans* beschrieben ist. Durch Zugabe von Bicarbonat sind die Zellen vollständig regenerierbar. Im Gegensatz zu einer Stickstoffchlorose, die reguliert in drei Phasen abläuft (Görl et al., 1998), steigt aber der Glycogengehalt der Zellen nicht an, sondern ist, wie beim Wildtyp, sehr niedrig. Auch werden die Phycobiliproteine und Chlorophyll a nicht vollständig abgebaut. Die Zellen wachsen sogar langsam weiter, wie der Wildtyp. PII liegt in MPphA phosphoryliert als PII<sup>3,2,1</sup> vor, sollte aber unter diesen Kohlenstoff-Mangelbedingungen nicht mit 2-Oxoglutarat ligandiert sein.

Bei Wachstum von MPphA unter Kohlenstoff-Mangelbedingungen in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> supplementiertem Medium erfolgt kein Ausbleichen der Zellen. PII liegt hier, wie im Wildtyp, völlig dephosphoryliert und vermutlich nicht mit 2-Oxoglutarat ligandiert vor. Die Mutanten MP2-D und E dagegen bleichen sowohl in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Medium, als auch in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Medium aus und sind auch nicht regenerierbar. Das Ausbleichen der Zellen findet demnach nur dann statt, wenn PII phosphoryliert vorliegt. Der dem Ausbleichen zugrundeliegende Nährstoffmangel ist möglicherweise durch ein defektes Ci-Aufnahmesystem bedingt.

Hisbergues et al., (1999) stellten fest, daß der Phosphorylierungszustand von PII nicht wesentlich für die Regulation des HAT Systems (high affinity transport) ist und daß der Komplex von PII mit 2-Oxoglutarat dafür verantwortlich sein könnte. Bei Wachstum mit Nitrat unter hoch-CO<sub>2</sub> Bedingungen liegt PII phosphoryliert und vermutlich mit 2-Oxoglutarat ligandiert vor. HAT ist unter diesen Bedingungen inaktiv. Bei Wachstum mit NH<sub>3</sub> unter hoch-CO<sub>2</sub> Bedingungen liegt PII dephosphoryliert und vermutlich ebenfalls mit 2-Oxoglutarat ligandiert vor, HAT ist dabei ebenfalls inaktiv (Hisbergues et al., 1999). Normalerweise würde diese Form von PII durch die PII-Kinase phosphoryliert werden. Hier könnte möglicherweise die bei Wachstum mit Ammonium reduzierte Menge an ATP eine Rolle spielen. *In vitro* wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung von PII durch die Kinase eine hohe Menge an ATP benötigt (Dierks, 1997; Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995b). Möglicherweise steht bei Wachstum mit NH<sub>3</sub> unter hoch-CO<sub>2</sub> Bedingungen nicht ausreichend ATP für die Aktivierung der Kinase zur Verfügung und PII liegt nicht-phosphoryliert und mit

2-Oxoglutarat ligandiert stabil vor. Intrazellulärer Kohlenstoffmangel bewirkt in BG11<sup>N</sup>-Medium bei MPphA keine Dephosphorylierung von PII-P. Das dort phosphoryliert vorliegende PII-Protein inaktiviert möglicherweise das HAT-Aufnahmesystem. Die einzige Form von PII, die HAT nicht reprimieren würde, wäre demzufolge nicht-phosphoryliertes und nicht-ligandiertes PII.

Der von Omata et al., (1999) beschriebene hochaffine-Bicarbonattransporter BCT1 (CmpABCD) besitzt eine C-terminale Domäne am CmpC Protein, die zu 30 % zu derjenigen von NrtC identisch ist. Diese Domäne von CmpC hat möglicherweise regulatorische Funktion für die Aufnahme von Bicarbonat. In Übereinstimmung mit den Mutantenanalysen könnte die BCT1 vermittelte Aufnahme von Bicarbonat demzufolge reziprok zur Nitrataufnahme durch NrtABCD reguliert sein.

Ein unvollständiger Abbau der Phycobiliproteine und bis zu vier weitere Zellteilungen werden von Collier und Grossmann (1992) bei Mangel an Phosphor in *Synechococcus* PCC 7942 beschrieben. Schwarz und Grossmann (1998) zeigen, daß die Menge an NblA den teilweisen oder vollständigen Abbau der Phycobiliproteine reguliert. Die Aktivierung von NblA ist wiederum durch den response-Regulator NblR vermittelt, der verschiedene Nährstoffmängel in eine zelluläre Antwort umsetzt. Sauer et al., (1999) zeigen, daß MP2 zu einer normalen Chlorose bei Stickstoffmangel fähig ist, und daß PII demzufolge nicht für die Umsetzung des Hungersignals benötigt wird. Das Ausbleichen von MPphA, MP2-D und MP2-E bei Kohlenstoffmangel weist aber darauf hin, daß ein fehlreguliertes, phosphoryliertes PII selbst, oder eine dadurch beeinflusste weitere Komponente ein solches Signal zu vermitteln vermag. Über NblR könnte die Expression von *nblA* aktiviert werden, wodurch der Abbau der Phycobiliproteine initiiert werden würde. Ob PII-P tatsächlich das Signal für diese Chlorose darstellt, könnte mit MP2 oder  $\Delta$ PII *Synechocystis* bei niedriger CO<sub>2</sub> Versorgung untersucht werden. Auch Untersuchungen zur Expression von *nblA* in MPphA wären hilfreich.

## 2. Biochemische Eigenschaften

Die biochemischen Eigenschaften der teilgereinigten PII-P Phosphatasepräparation aus *Synechococcus* PCC 7942 und der in *E.coli* überexprimierten und gereinigten PII-P Phosphatase PphA aus *Synechocystis* PCC 6803 zeigen eine völlige Übereinstimmung. Es kann daher angenommen werden, daß der teilgereinigte Extrakt keine weiteren Phosphatasen



enthielt und daß das zu PphA homologe Enzym erfaßt wurde. Die Aktivität beider Enzyme benötigt essentiell  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Ionen, während der Komplexbildner EDTA die Aktivität völlig hemmt (Sanner S., 1996). Beide Enzymaktivitäten werden nicht durch spezifische Phosphataseinhibitoren beeinträchtigt, einzig der unspezifische Inhibitor Kaliumfluorid und EDTA hemmen die Aktivität völlig. Das Inhibitionsmuster ist bei den Substraten PII-P und Phosphocasein fast identisch. Die Stoffwirkung ist daher substratunabhängig und direkt auf die enzymatische Aktivität gerichtet.

Die  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit und das Inhibitionsmuster sind typisch für PP2C-Phosphatasen, von denen bereits einige Vertreter bei Eubakterien beschrieben sind, wie z.B. SpoIIE und PrpC aus *B.subtilis* (Adler et al., 1997; Obuchowski et al., 2000) und IcfG aus *Synechocystis* PCC 6803 (Shi et al., 1999).

### Substratspezifität

Beide Enzyme sind in der Lage, neben dem natürlichen Substrat PII-P, auch an Serin/Threoninresten phosphoryliertes Phosphocasein, Phosphohistone H2A und H2B, welches typische Substrate von Serin/Threonin Phosphatasen sind, äußerst effektiv zu dephosphorylieren. Auch Oligopeptide werden von beiden Enzymen dephosphoryliert, wobei PphA ein synthetisches, an einem Tyrosinrest phosphoryliertes Phosphatasesubstrat T ca. 4-fach schneller umsetzt als ein entsprechendes Serin-phosphoryliertes Substrat S

Eine höhere Aktivität gegenüber phosphoryliertem Threonin (Substrat T) wurde auch für die humane PP2C-Phosphatase und für Pph1 gezeigt (Deana et al., 1990; Treuner-Lange et al., 2001). Möglicherweise existieren *in vivo* weitere an Serin- oder Threoninresten phosphorylierte Substrate.

Die Dephosphorylierung des an einem Tyrosinrest phosphorylierten Oligosubstrates dagegen ist ungewöhnlich und für Prokaryonten bisher nicht beschrieben. Trotz O-Phosphorylierung wird P-Tyrosin durch eine eigene Phosphatasefamilie, die der Proteintyrosinphosphatasen (PTP's) oder durch „dual specificity“ Phosphatasen, die Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphate erkennen, dephosphoryliert. Ein Beispiel für eine „dual specificity“ Phosphatase ist IphP aus *Nostoc commune* (Howell et al., 1996). Die einzige, bisher beschriebene PP2C Phosphatase, die P-Serin und P-Tyrosin dephosphoryliert, ist NERPP-2C aus Rattenhirn (Labes et al., 1998). Wie Kim et al., (1993) formulierten, kann eine Subklasse von Tyrosinphosphatasen unter bestimmten Bedingungen Phosphoserin- und

Phosphothreoninreste dephosphorylieren und PP2A- und PP2B-Phosphatasen sollen unter bestimmten Bedingungen das Potential zur Dephosphorylierung von Phosphotyrosin haben. Da PP1, 2A und PP2C-Phosphatasen auch Phosphohistidine dephosphorylieren, könnte aufgrund dieser Variabilität gegenüber phosphorylierten Substraten ebenfalls eine Subklasse von PP2C-Phosphatasen ein auf Phosphotyrosine erweitertes Substratspektrum besitzen. PphA würde demnach in diese neue Subklasse gehören. Möglicherweise ist bisher aber auch nicht bei allen beschriebenen PP2C Phosphatasen die Aktivität gegen Phosphotyrosine getestet worden und diese Dephosphorylierung wäre häufiger als bisher angenommen.

Quantitative Bestimmungen ergaben für das an Serin-/ Threoninresten phosphorylierte Phosphocasein eine maximale Umsatzrate von  $12,5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ pmol}^{-1}$ .

Interessant wäre es nun, die Umsatzrate von PII-P zu erfassen. Aufgrund der unterschiedlich schnell verlaufenden 3-stufigen Dephosphorylierung von  $\text{PII-P}^3 > \text{PII-P}^2 > \text{PII-P}^1 > \text{PII}^0$  und auch wegen des Detektionssystems durch Immunoblotanalyse, war eine exakte Quantifikation nicht möglich. Eine Abschätzung der PII-P Umsatzraten kann aber durchgeführt werden. Bei 88 % Dephosphorylierung von PII-P (nur die Formen  $\text{PII}^{0,1}$  sind noch vorhanden) setzen 1 pmol Enzym 0,5 pmol Substrat pro min um. Bei 50 % Dephosphorylierung von PII-P ( $\text{PII}^3$  ist zu 100 % und  $\text{PII}^2$  zu ca. 70 % verschwunden; siehe 2 min Wert in Abb.16 A des Ergebnisteils) werden ca. 1 pmol Substrat pro min pro 1 pmol Enzym umgesetzt.  $\text{PII}^2$  ist möglicherweise ein schlechteres Substrat als  $\text{PII}^3$  und wird daher langsamer umgesetzt. Um die unterschiedlichen Umsetzungsgeschwindigkeiten der PII-Isoformen zu erfassen, müssten diese einzeln gereinigt und in Enzymkinetiken eingesetzt werden.

Die maximale Umsetzung von Phosphocasein beträgt  $12,5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ pmol}^{-1}$  Enzym. Unter Zugrundelegung der in den PII-P Dephosphorylierungstest eingesetzten Substratmenge von 39 nM (als Trimer), würden noch 2,5 pmol Phosphocasein pro pmol Enzym pro min umgesetzt werden, das 2,5-fache der Umsetzung von PII-P.

Wenn man nun einen ähnlichen  $K_M$  Wert für PII-P wie für Phosphocasein, nämlich 200 nM, annimmt, ist die in den PII-P Test eingesetzte Substratmenge von 39 nM ca. 5-fach niedriger als die von Phosphocasein und die Reaktion wäre sehr substratlimitiert. In der Zelle beträgt der Anteil des PII Proteins 0,1 % des Gesamtproteingehaltes (Tsinoremas et al., 1991), was einer Konzentration von 28  $\mu\text{M}$  PII (Trimer) entspricht und liegt damit ca. 100-fach über dem angenommenen  $K_M$ -Wert und fast 1000-fach über der in den PII-P Dephosphorylierungstest eingesetzten Substratmenge. Ohne Substratlimitierung könnte die Reaktion *in vivo* bei  $V_{\max}$

ablaufen. Da bei einer Substratkonzentration unterhalb des  $K_M$ -Wertes die Reaktionsgeschwindigkeit annähernd linear zur Substratkonzentration verläuft, könnte die langsamere Umsetzung des Originalsubstrates damit erklären werden.

### **Beeinflußung der Aktivität**

Für die Aktivität von PphA sind  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Ionen essentiell.  $Mn^{2+}$  wirkt, wie bei PP2C $\alpha$ , in geringerer Konzentration (Fjeld et al., 1999) und scheint die Substratspezifität durch Aufweitung des katalytischen Zentrums herabzusetzen, wie es bei ganz unterschiedlichen Arten von Enzymen der Fall ist. So sind für die Dephosphorylierung von *p*-NPP  $Mn^{2+}$ -Ionen absolut notwendig, während bei PII-P und Phosphocasein nur die anfängliche Dephosphorylierungsgeschwindigkeit leicht erhöht scheint.  $Zn^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen haben einen partiellen Hemmeffekt und  $Fe^{2+}$ , das die humane PP2C $\alpha$  1000-fach stärker aktiviert als  $Mg^{2+}$  (Fjeld et al., (1999) zeigt keinen Effekt. Möglicherweise ist diese Aktivierung durch  $Fe^{2+}$ , die für keine andere PP2C-Phosphatase beschrieben ist, spezifisch für PP2C $\alpha$ .

Hisbergues et al. (1999) postulierten eine vom Redoxstatus der Zelle abhängige Phosphorylierung des PII-2-Oxoglutarat Komplexes wobei entweder die PII-P Phosphatase oder die Kinase als Sensor fungieren sollen. Die *in vitro* Analysen mit PphA zeigten jedoch eine vom Redoxzustand unabhängige und stabile Aktivität und schließen damit eine Redoxsensorik aus. Nicht auszuschließen ist aber eine solche Funktion für die PII Kinase, die bisher nicht eindeutig charakterisiert ist. Eine solche Sensierung könnte über eine PAS Domäne erfolgen.

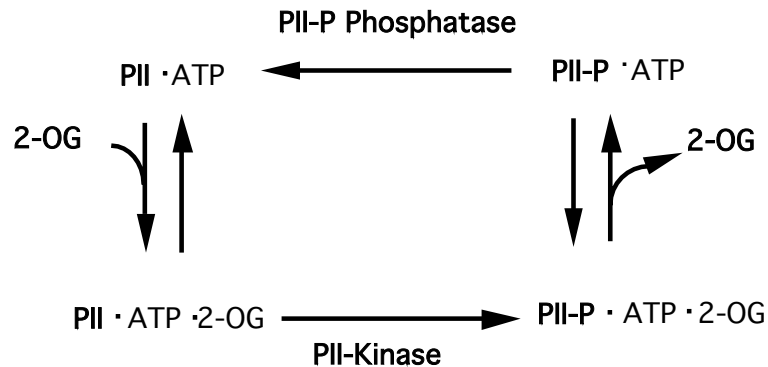
### **Synergistische Hemmung der PII-P Dephosphorylierung durch ATP und 2-Oxoglutarat**

Die Dephosphorylierung von PII-P kann *in vitro* durch ATP und 2-Oxoglutarat vollständig verhindert werden, wobei in physiologischen Konzentrationen keiner der beiden Metaboliten in Abwesenheit des anderen diesen Effekt bewirkt. Der Phosphorylierungsgrad von PII reagiert sehr sensitiv auf die unterschiedlichen 2-Oxoglutarat Konzentrationen, wobei aber 2-Oxoglutarat alleine keine Hemmwirkung auslöst. ATP alleine hat durchaus eine hemmende Wirkung, die bei einer Konzentration von 1 mM ATP bis 40 % Hemmung erreichen kann.

Die Dephosphorylierung von Phosphocasein ist nicht beeinträchtigt, so daß hier, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Phosphatase-Inhibitoren, der Effekt dieser Metaboliten alleine über das PII Protein vermittelt wird und nicht durch direkte Hemmung der enzymatischen Aktivität der PII-P Phosphatase. Forchhammer und Hedler (1997) wiesen in detaillierten Bindungsstudien den synergistischen Charakter der PII Ligandierung durch ATP und 2-Oxoglutarat nach, der im Prinzip demjenigen von *E.coli* entspricht (Kamberov et al., 1995). Sowohl bei *Synechococcus* PCC 7942 als auch bei *E.coli* erfolgt keine Bindung von 2-Oxoglutarat an PII in Abwesenheit von ATP. Bei einer physiologischen ATP Konzentration von 2,5 mM findet eine starke Stimulierung der 2-Oxoglutarat Bindung statt. In Anwesenheit von 2 mM 2-Oxoglutarat ist die Bindung von ATP mit  $K_d$  Werten von 0,24  $\mu$ M bei *E.coli* und 0,5  $\mu$ M bei *Synechococcus* sehr stark. Die Bindungen von ATP und 2-Oxoglutarat beeinflussen sich also in beiden Organismen wechselseitig. In *E.coli* ist die Konzentration an Glutamin der Regulator der Uridylyl-transferase/Uridylyl-Hydrolyse Aktivität, die für die PII Modifikation verantwortlich ist (Jiang et al., 1998). In *Synechococcus* wurde in dem teilgereinigten Extrakt kein Effekt von Glutamin oder Glutamat nachgewiesen und *in vitro* wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung von PII spezifisch von ATP und 2-Oxoglutarat abhängt (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995b). Im Gegensatz zu dem enterobakteriellen System, ist in Cyanobakterien, aufgrund der fehlenden 2-Oxoglutaratdehydrogenase, 2-Oxoglutarat als alleiniger Stickstoffsensor möglich.

Die *in vitro* und *in vivo* Daten, sowie die Bindungsanalysen und die Ergebnisse der Zellpermeabilisierungen (Irmeler, 1997) können zu einem Modell formuliert werden, das die Kontrolle der PII Phosphorylierung erklärt (Abb. 25). Unter den meisten Wachstumsbedingungen wird der zelluläre ATP Spiegel höher sein, als für die Bindung an PII nötig ist, so daß PII unter physiologischen Bedingungen mit ATP ligandiert vorliegt. Die 2-Oxoglutarat Konzentration in der Zelle wird demnach die Aktivitäten der PII Kinase und der PII-P Phosphatase durch Ligandierung von PII bestimmen. Stickstoffmangel führt zu einer hohen 2-Oxoglutarat Konzentration (Mangum et al., 1973) wodurch die PII Kinase aktiviert und die PII-P Phosphatase inhibiert wird, was zu einer Phosphorylierung von PII führt. Bei CO<sub>2</sub> Mangel, oder bei Wachstum in Anwesenheit von Ammonium, ist die zelluläre 2-Oxoglutaratkonzentration niedrig, wodurch die PII-Kinase inaktiv ist, die PII-P Phosphatase aktiviert wird und PII-P dadurch dephosphoryliert wird. Durch die entgegengesetzte Regulation von Kinase und Phosphatase durch 2-Oxoglutarat wird ein sinnloser Zyklus von Phosphorylierung und Dephosphorylierung vermieden (Irmeler et al., 1997). PII stellt in

diesem Modell ein 2-Oxoglutarat sensierendes System dar. Ähnlich dem PII-System von *E.coli*, könnte auch hier das ligandierte, nicht phosphorylierte PII, bereits mit potentiellen, bisher nicht definierten Partnern interagieren. Die Phosphorylierung könnte eine zeitliche Verzögerung auf die Änderung der 2-Oxoglutaratkonzentration darstellen.



**Abbildung 25:** Modell von PII als 2-Oxoglutarat Sensor.

### Einfluß von Nukleotidphosphaten

Im Gegensatz zu dem PII-Protein von *E.coli*, bei dem die Bindung von 2-Oxoglutarat an PII ausschließlich von der Anwesenheit von ATP abhängt und kein anderes Nukleotid ATP ersetzen kann (Kamberov et al., 1995), haben bei PphA von *Synechocystis* andere Nukleotide wie ADP, GTP und AMP-PCP durchaus einen Effekt, wobei vorausgesetzt wird, daß einem Effekt eine Bindung an PII vorausgeht. Eine hydrolytische Reaktion ist offensichtlich nicht nötig. Möglicherweise ist die ATP Bindetasche des cyanobakteriellen PII weiter und damit unspezifischer, so daß Purin- und Pyrimidinnukleotidphosphate binden können. UTP bindet ausschließlich in Anwesenheit von 2-Oxoglutarat, das vermutlich erst die konformelle Änderung von PII für die UTP Bindung schafft. In diesem Falle wäre die Bindung nicht gegenseitig abhängig, sondern einseitig beeinflusst. Weshalb das bei UTP der Fall ist, ist unklar. Diese Unspezifität der Nukleotidbindung könnte auch die schwache synergistische Wirkung von AMP-PCP und ADP mit 2-Oxoglutarat erklären.

Der Phosphorylierungszustand von PII könnte durch eine abgestufte Affinität der einzelnen Nukleotidphosphate und der aktuell vorhandenen Menge an 2-Oxoglutarat modifiziert werden, wobei ATP als stärkster "Motor" wirkt. Durch eine konzertierte Wirkung aller Nukleotidphosphate würde auch die Gesamtenergieladung der Zelle miteinbezogen werden, die an einer Feinregulierung mitwirken könnte.

Diese Hemmeffekte erfolgen nur mit dem Substrat PII-P, mit Phosphocasein als Substrat findet keine Hemmung der Dephosphorylierung statt, so daß die Aktivität von PphA indirekt über die Konformation des PII Proteins geregelt wird.

### **Wirkung von Metaboliten**

Zusätzlich zu 2-Oxoglutarat wirken auch alle untersuchten Metaboliten des C- und N-Stoffwechsels in Anwesenheit von ATP hemmend auf die Dephosphorylierung von PII-P, nicht aber auf diejenige von Phosphocasein, so daß angenommen werden kann, daß dieser Effekt ebenfalls über PII-P erfolgt. Möglicherweise kann die Bindestelle für 2-Oxoglutarat auch von anderen, ähnlichen Molekülen besetzt werden. Dieser durchwegs synergistische Hemmeffekt drosselt die Aktivität drastisch. Bei 2-Oxoglutarat beträgt die Hemmung 100 %, die anderen Metaboliten weisen eine intermediäre Hemmung von 48 % bei Oxalacetat bis 23 % bei Glutamat auf. Pyruvat, Oxalacetat und 2-Oxoglutarat als Vorstufen der Biosynthese von Aminosäuren könnten eine Rückkopplung vermitteln. Insgesamt könnten die verschiedenen Metaboliten, durch abgestufte Wirkungsstärken ebenfalls ein erweitertes Spektrum zur Feinregulierung des PII Systems darstellen. Auch für das *E.coli* PII Protein wird eine Bindung von Oxalacetat, Glutamat und Pyruvat beschrieben, wobei aber 2-Oxoglutarat die größte physiologische Relevanz aufweist (Kamberov et al., 1995). Die Möglichkeit der Modulation von PII durch verschiedene Kohlenstoffsignale bleibt aber bestehen (Ninfa and Atkinson, 2000). Ein weiterer, evolutiver Aspekt, der von Liu et al (1995) entwickelt und von Kamberov (1995) auf das *E.coli* PII bezogen wurde, könnte ebenfalls auf das cyanobakterielle PII angewandt werden (Forchhammer und Hedler, 1997). Demnach wäre PII selbst, durch die Ligandierung mit verschiedenen kleinen Molekülen, in der Lage zur Stickstoffsensierung. Bei *E.coli* hätte sich im Laufe der Zeit eine Erweiterung der Sensierung auf das UTase/UR Enzym entwickelt. Bei dem cyanobakteriellen System, bei dem eine solche Ausweitung bisher nicht nachgewiesen wurde, könnte es sich um ein evolutiv altes, aber durchaus effektives System der Stickstoffsensierung handeln. Durch den inkompletten Tricarbonsäurezyklus in Cyanobakterien ist der hohe Stellenwert von 2-Oxoglutarat möglich. Um die Regulation des PII System weiter zu entschlüsseln, wäre es notwendig auch die Funktion der PII Kinase aufzudecken.

#### 4. PphA und weitere PP2C Phosphatasen

Im Vergleich der Aminosäuresequenzen von PphA mit PPh1 aus *Myxococcus xanthus*, PrpC aus *Bacillus subtilis*, fünf weiteren putativen PP2C Phosphatasen und der humanen PP2C $\alpha$  als Referenz, konnten die von Bork et al. (1996) definierten elf Phosphatasemotive eindeutig zugeordnet werden. Die invarianten zehn Aminosäuren, von denen die geladenen Aspartatreste 38, 60, 239 und 282, gezählt an PP2C $\alpha$ , wesentlich an der Metallbindung und damit an der Phosphaterkennung beteiligt sind (Das et al., 1996), sind ebenfalls konserviert. Die bakteriellen PP2C Motive sind sehr einheitlich und heben sich von der humanen PP2C $\alpha$  ab. Basierend auf konservierten Sequenzmotiven erstellten Bork et al. (1996) einen phylogenetischen Stammbaum, aufgrunddessen die divergente PP2C-Phosphatase Familie in sechs Subfamilien eingeteilt werden konnte. Die bakteriellen Phosphatasen werden hierbei in 2 Subfamilien aufgespalten, die in der Einteilung von Treuner-Lange (2001) als Gruppe I und III bezeichnet werden. Interessanterweise befindet sich PphA im Stammbaum entfernt von den anderen PP2C-Phosphatasen aus *Synechocystis* in der Gruppe I bakterieller PP2C-Phosphatasen. Diese Gruppe umfaßt hauptsächlich Phosphatasen mit geringem Molekulargewicht, welche keine zusätzlichen Domänen tragen. Gruppe III und Gruppe I sind aber nicht eindeutig zu trennen und es gibt offenbar fließende Übergänge.

Die geringe Homologie der einzelnen Subfamilien oder Gruppen zueinander mag auf einer extremen Divergenz, ausgehend von einem gemeinsamen Phosphatasevorfahren beruhen, oder aber ist Zeichen einer konvergenten, strukturell - funktionalen Entwicklung nicht verwandter Proteine zu einer gemeinsamen Serin/Threonin Phosphatasearchitektur (Adler et al., 1997).

Wie die Datenbankanalyse mit PphA zeigte, sind mittlerweile viele putative PP2C-Phosphatasen aus Bakterien erfaßt, aber nur von sehr wenigen ist überhaupt eine Phosphatasefunktion gezeigt und das *in vivo* Substrat bekannt.

Die Aminosäuresequenzen von Pph1 aus *Myxococcus xanthus* und PrpC aus *Bacillus subtilis* weisen 34 % Identität zu PphA auf, was bei der Variabilität der Phosphatasen relativ hoch ist. *In vitro* konnte für Pph1 mit gereinigtem PII-P Protein aus *Synechococcus* eine schwache Dephosphorylierung nachgewiesen werden, ob *in vivo* aber PII-P dephosphoryliert wird ist unklar und ein PII-Protein aus *Myxococcus xanthus* ist bislang nicht bekannt. Das PII-Protein aus *Bacillus subtilis* hat nur 32 % Identität zum PII von *Synechocystis* und trägt anstelle des Serin 49 ein Valin, was eine Modifikation durch Phosphorylierung an dieser Stelle unmöglich macht.

Die Aminosäuresequenzen von PphA und einer putativen Phosphatase aus *Deinococcus radiodurans* sind mit 42 % Identität höher. Die PII-Proteine beide Organismen weisen eine Identität von 43 % auf, aber anstelle eines Serin 49 findet sich bei dem PII-Protein von *Deinococcus radiodurans* ein Asparagin. Eine Phosphorylierung ist an dieser Stelle nicht möglich. Möglicherweise könnte aber die Tertiärstruktur dieses PII Proteins verändert sein, so daß der T-loop, der die phosphorylierbare Aminosäure trägt einer anderen Sequenzposition entstammt.

Sehr hohe Sequenzidentitäten zu PphA weisen zwei putative Phosphatasen aus *Anabaena* PCC 7120 mit 55 % und aus *Nostoc punctiforme* mit 54 % auf. Auch die PII-Proteine aus *Nostoc* und *Anabaena* haben 87 % und 85 % Identität zu demjenigen aus *Synechocystis* und enthalten an Position 49 einen Serinrest. Diese putativen PP2C Phosphatasen könnten, wie PphA, PII-P als Substrat dephosphorylieren, eine Vermutung, die aber biochemisch bestätigt werden muß.





## Literaturverzeichnis

### A

- Adler** S.P., Purich D. and Stadtman E.R. (1975), *J. Biol. Chem.* 250: 6264-6272
- Adler** E., Donella-Deana A., Arigoni F., Pinna L. and Stragier P. (1997), *Mol.Mikrobiol.* 23: (57-62)
- Aiba** H., Adhya S., Crombrugghe B. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11905-11910
- Aichi** M. and Omata T. (1997), *J. Bacteriol.* 179: 4671-4675
- Atkinson** M R., Kamberov E.S., Weiss R L. and Ninfa A.J. (1994), *J.Biol Chem.* 269 (45): 28288- 28293
- Atkinson** M.R. and Ninfa A.J. (1998), *Mol. Microbiol.* 29: 431-447
- Ausubel** F.M. Brent R., Kingston R.I., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1997), *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley and Sons

### B

- Bédu** S., Pozuelos P., Cami B. and Joset F. (1995), *Mol. Microbiol.* 18 (3): 559-568
- Blum** H., Beier H. and Gross H.J. (1987), *Electrophoresis* 8: 93-99
- Bork** P., Brown N.P., Hegyi H. and Schultz J. (1996), *Protein science*, 5: 1421-1425.
- Bradford** M.M. (1976), *Anal Biochem.* 72: 248-252

### C

- Cohen** Patricia., in *Protein phosphorylation*, D.G. Hardie, the practical approach series, 1992
- Cohen** Philip (1989), *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453-508
- Cohen-Kupiec** R., Guerevitz M., Zilberstein A. (1993), *J. Bacteriol.* 175: 7727-7731
- Collier** J.L. and Grossman A.R. (1992), *J. Bacteriol.* 174: 4718-4726

### D

- Das** A.K., Helps N.R., Cohen P.T.W., Barford D. (1996), *EMBO Journal* 15: 6798-6809
- Deana** A.D., Mac Gowan C.H., Cohen P., Marchiori F., Meyer H.E. and Pinna L.A. (1990), *Biochim. et Biophys. Acta* 1051: 199-202
- Dierks** H. (1997), *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München*
- Douglas** S.E., (1994) in „*The Molecular Biology of Cyanobacteria*“ ed. by D.A. Bryant, Kluwer A.P. pp: 91-118

**F**

- Fiedler S.** and Wirth R. (1988), *Analyt. Biochem.* *170*: 38-44
- Fjeld C.C.** and Denu J.M. (1999), *J.Biol.Chem.* *274*: 20336-20343
- Flores E.**, Romero J.M., Guerrero M.G. and Losada M. (1983), *Biochim. et Biophys. Acta* *725*: 529-532
- Flores E.** and Herrero A. (1994), in „The Molecular Biology of Cyanobacteria“ ed. by D.A. Bryant, Kluwer A.P. pp: 487-517
- Forchhammer K.** and Tandeau de Marsac N. (1994), *J. Bacteriol.* *176*: 84-91
- Forchhammer K.** and Tandeau de Marsac N. (1995a), *J. Bacteriol.* *177*: 2033-2040
- Forchhammer K.** and Tandeau de Marsac N. (1995b), *J. Bacteriol.* *177*: 5812-5817
- Forchhammer K.** and Hedler A. (1997), *Eur.J.Biochem.* *244*: 869-875
- Forchhammer K.**, Hedler A., Strobel H. and Weiss V. (1999), *Mol. Microbiol.* *33*: 338-349
- Fujita Y.**, Muramaki A., Aizawa K and Ohki K. (1994), in „The Molecular Biology of Cyanobacteria“ ed. by D.A. Bryant, Kluwer A.P. pp: 487-517

**G**

- García-Domínguez M.** and Florencio F.J. (1997), *Plant Mol. Biol.* *35*: 723-734
- García-Domínguez M.**, Reyes J.C., Florencio F.J. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *96*: 7161-7166
- García-Domínguez M.**, Reyes J.C., Florencio F.J. (2000), *Mol. Microbiol.* *35* (5): 1192-2001
- Görl M.** (1997) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München
- Görl M.**, Sauer J., Baier T. and Forchhammer K. (1998), *Microbiol.* *144*: 2449-2458
- Golden S.S.**, Brusslan J. and Haselkorn R. (1987), *Methods Enzymol.* *153*, 215-231
- Grigorieva G.** and Shestakov S.V. (1982), *FEMS Lett.* *13*: 367-370
- Grivitz S.C.** , Bachetti S., Rainbow A.J. and Graham F.L. (1980), *Anal. Biochem.* *106*: 492-496
- Grossman A.R.**, Schaefer M.R., Chiang G.G. and Collier J.L. (1994) in „The Molecular Biology of Cyanobacteria“ ed. by D.A. Bryant, Kluwer A.P. pp: 642-675

**H**

- Hagemann M.**, Gollack D., Biggins J. and Erdmann N. (1993), *FEMS Microbiol Letters* *113*: 205-210
- Hanahan D.** (1985), in *DNA cloning Vol 1*, IRC, Oxford: 109-135

- Harrison** M.A., Keen J.N., Findlay J.B.C. and Allen J.F. (1990), *FEBS Lett.* 264: 25-28
- He** L., Soupene E. Ninfa A. and Kustu S. (1998), *J. Bacteriol.* 180: 6661-6667
- He** M., Wilde A. and Kaderbhai M.A. (1990), *Nucl. Acid. Res.* 18: 1600
- Herrero** A and Guerrero M.G. (1986), *J. Gen. Microbiol.* 132: 2463-2468
- Herrero** A., Muro-Pastor A. and Flores E. (2001), *J. Bacteriol.* 183 (2): 411-425
- Hisbergues** M., Jeanjean R., Joset F., Tandeau de Marsac N., Bedu S. (1999), *FEBS Letters* 463, 216-220
- Howell** L.D., Griffiths C., Slade L.W., Potts M. and Kennelly P.J. (1996), *Biochem.* 35: 7566-7572
- Huckauf** J., Nomura C., Forchhammer K. and Hagemann M. (2000), *Microbiology* 146: 2877-2889
- Hunter** T. (1995), *Cell* 80: 225-236

## I

- Irmeler** A. (1997), Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München
- Irmeler** A., Sanner S., Dierks H. and Forchhammer K. (1997), *Mol. Microbiol.* 25: 81-90

## J

- Jiang** P., Peliska J.A. and Ninfa A.J. (1998 b), *Biochem.* 37: 12782-12794
- Jiang** P., Peliska J.A. and Ninfa A.J. (1998 c), *Biochem.* 37: 12802-12810
- Jiang** P., Zucker P., Atkinson M.R., Kamberov E.S., Tirsophon W., Chandran P., Schefke B.R. and Ninfa A. (1997), *J. Bacteriol.* 179: 4342-4353
- Jiang** F., Mannrevik B., Bergman B. (1997), *Biochem J.* 327: 513-517
- Jiang** P. and Ninfa A. (1999), *J. Bacteriol.* 181: 1906-1911

## K

- Kaneko** T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S. (1996), *DNA Research* 3: 109-136
- Kaplan** A., Schwarz R., Liernan-Hurwitz J., Ronen-Tarazi M. and Reinhlod L. (1994), in „The Molecular Biology of Cyanobacteria“ ed. by D.A. Bryant, Kluwer A.P. pp: 469-485
- Kamberov** E.S., Atkinson M.R. and Ninfa A.J., 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 17797-17807

**Kennelly J.P.**, Oxenrider K.A., Leng J., Cantwell J.S. and Zhao N. (1993), *J.Biol.Chem.* 268: 6505-6510

**Kennelly P.J.** and Potts M. (1999), *Frontiers in Bioscience* 4: 372-385

**Kennelly P.J.** and Potts M. (1996), *J. Bacteriol.* 178: 4759-4764

**Kikuchi H.**, Aichi M., Suzuki I. and Omata T. (1996), *J. Bacteriol.* 178: 5822-5825

**Kim Y.**, Huang J., Cohen P. and Matthews H.R. (1993), *J. Biol. Chem.* 268: 18513-18518

**Kobayashi M.**, Rodriguez R., Lara C. and Omata T. (1997), *J.Biol.Chem.* 272: 27197-27201

**Kuhlemeier C.J.**, Thoma A.A.M., van der Ende A., van Leen R.W., Borrias W.E., van der Hondel C.A. and van Arkel G.A. (1983), *Plasmid* 10: 156-163

## L

**Labes M.**, Roder J and Roach A. (1998), *Mol. and Cell. Neuroscience* 12: 29-47

**Laemmli U.K.** (1970), *Nature* 227: 680-685

**Leonard C.J.**, Aravind L. and Koonin E.V. (1998), *Genome Re.* 8: 1038-1047

**Li L.A.**, Tabita F.R. (1994), *J Bacteriol.* 176 (21): 6697-706

**Liu J.** and Magasanik B. (1995), *J. Bacteriol.* 177 (4): 926-931

**Lee H.-M.**, Flores E., Herrero A., Houmard J and Tandeau de Marsac N. (1998), *FEBS Letters* 427: 291-295

**Lee H.-M.**, Flores E., Forchhammer K., Herrero A. and Tandeau de Marsac N. (2000), *Eur.J.Biochem.* 267: 591-600

**Luque I.**, Flores E., Herrero A. (1994), *Biochim. et Biophys. Acta* 1184: 296-298

**Luque I.**, Flores E and Herrero A. (1994), *EMBO* 13 (12): 2862-2869

## M

**Maeda S.I.**, Kawaguchi Y., Ohe T.A. and Omata T. (1998a), *J. Bacteriol.* 180 (16): 4080-4088

**Maeda S.I.**, Okamura M., Kobayashi M. and Omata T. (1998b), *J. Bacteriol.* 180: 6761-6763

**Maeda S.**, Price G.D., Badger M.R., Enomoto C. and Omata T. (2000), *J. Biol. Chem.* 275 (27): 20551-20555

**Maier T.** (1997), Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München

**Mangum J.H.**, Magni G. and Stadtman E.R. (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* 158: 514-525

**Mann N.H.** (1994), *Microbiol.* 140: 3207-3215

**Mérida A.**, Candéau P., Florencio F.J. (1991), *J. Bacteriol.* 173: 4095-4100

**Merrick M.J.** and Edwards R.A. (1995), *Microbiol. Rev.* 59 (4): 604-622

**Miller J.H.**(1992), *A short course in bacterial genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY

**Miller L.S.** and Holt S.C. (1977), Arch. Microbiol. 115: 185-198

**Montesinos M.L.**, Muro-Pastor A.M., Herrero A. and Flores E. (1998), J. Biol. Chem. 273: 31463-31470

**Mukhopadhyay S.**, Kapatral V., Xu W. and Chakrabarty A.M. (1999), J. Bacteriol. 181: 6615-6622

**Muro-Pastor M.I.**, Reyes J.C. and Florencio F.J. (1996), J. Bacteriol. 178: 4070-4076

**Muro-Pastor A.M.**, Herrero A. and Flores E. (2001), J. Bacteriol. 183 (3): 1090-1095

## N

**Ninfa J.A.** and Atkinson R.M. (2000), Review, Trends in Microbiol. 4: 172-179

## O

**Obuchowski M.**, Madec E., Delattre D., Boel G., Iwanicki A., Foulger D. and Seror S.J. (2000), J. Bacteriol. 182 (19): 5634-5638

**Omata T.**, Andriesse X. and Hirano A. (1993), Mol. Gen. Genet. 236: 193-202

**Omata T.**, Price G.D., Badger M.R., Okamura M., Gotha S. and Ogawa T. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (23): 13571-13576

## P

**Perraud A.L.**, Weiss V. and Gross R. (1999), Trends in Microbiol. 7 (3): 115-121

**Pioszak A.A.**, Jiang P. and Ninfa A.J. (2000), Biochem. 39 (44): 13450-13461

**Potts M.**, Sun H., Mockaitis K., Kennelly. P.J., Reed D. and Tonks N.K. (1993), J. Biol. Chem. 268: 7632-7635

## R

**Reitzer J.L.** and Magasanik B. (1987), in Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Magasanik B., Schaechter M and Umberger H.E. (eds.); *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, pp 312-320; AMS Washington DC

**Reyes J.C.**, Florencio F.J. (1994), J. Bacteriol. 176 (5): 1260-7

**Reyes C.J.**, Muro-Pastor M.I. and Florencio F.J. (1997), J. Bacteriol. 179 (8): 2678-2689

**Rippka R.** (1989), Methods Enzymol. 167: 3-27

**Romero J.M.**, Lara C and Guerrero M.G. (1985), Arch. Biochem. and Biophys. 237: 396-401

**S**

- Saier** M. H., Jr, Chauvaux S., Deutscher J., Reizer J. and Ye J.J. (1995), *TIBS* 20: 267-271
- Saier** M.H., Jr, Wu L.F. and Reizer J. (1990), *TIBS* 15, 391-395
- Sambrook** J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989), *Mol.cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour
- Sanders** C.E., Melis A. and Allen J.F. (1989), *Biochim et Biophys. Acta* 976: 168-172
- Sanner** S. (1996), Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München
- Sauer** J., (2001) Dissertation am Lehrstuhl für Mikro- und Molekularbiologie der Justus Liebig Universität Gießen
- Sauer**J., Dirmeier U. and Forchhammer K. (2000), *J.Bacteriol.* 182 (19): 5615-5619
- Shi** L. and Carmichael W.W. (1997), *Arch. Microbiol.* 168: 528-531
- Shi** L., Potts M. and Kennelly J. (1998), *FEMS Microbiology reviews* 22: 229-253
- Shi** L., Bischoff K.M. and Kennelly P (1999), *J.Bacteriol.* 181(16): 4761-4767
- Snell** F.D. and Snell C.T. (1949), „Colorimetric methods of anlysis“ 3: 804-805. Van Nostrand NY
- Stanier** R.Y. and Cohen Bazire G. (1977), *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 225-257
- Studier** F.W. and Moffat (1986), *J.Mol.Biol.* 189: 113-130

**T**

- Tabor** S. and Richardson C.C. (1985), *Proc. Natl. Sci. USA* 262: 1074-1078
- Tandeau de Marsac** N. and Houmard J. (1993), *FEMS Microbiol Rev.* 104: 119-190
- Tapia** M.I., Llama M.J. and Serra J.L. (1995), *Phys. Plant.* 94: 241-246
- Thompson** J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F and Higgins D.G., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882
- Tsinoremas** N.F., Castets A.M., Harrison M.A., Allen J.F. and Tandeau de Marsac N. (1991), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 4565-4569

**V**

- Van Heeswijk** W.C., Hoving S., Molenaar D., Stegeman B., Kahn D and Westerhoff H.V. (1996), *Mol. Microbiol.* 21: 133.146
- Vega-Palas** M.A., Flores E. and Herrero A. (1992), *Mol. Microbiol.* 6: 1853-1859

**W**

**Wera S.** and Hemmings B.A. (1995), *J.Biochem.* *311*: 17-29

**Wolk C.P.** (1973), *Bacteriol Rev.* *37*: 1835-1859

## **Y**

**Yang X.**, Kang C.M., Brody M.S. and Price C.W. (1996), *Genes Dev.* *10*: 2265-2275

**Yanisch-Perron C.**, Vieira C.J. and Messing J. (1985), *Gene* *33*: 103-109

## **Z**

**de Zamaroczy M.**, Paquelin A., Peltre G., Forchhammer K. and Elmerich C. (1996), *J. Bacteriol.* *178*: 4143-4149

**de Zamaroczy M.** (1998), *Mol. Microbiol.* *29*: 449-463

**Zhang C.C.** (1996), *Mol. Microbiol.* *20*: 9-15

**Zhang C.C.**, Gonzales L. and Phalip Vincent (1998), *Nucleic acid research*, *Vol 26*, No.16: 3619-3625

**Zhang C.C.**, Friry A. and Peng L. (1998), *J. Bacteriol.* *180*: 2616-2622